

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR
IBTISSEM TOLBA

DÉTERMINATION D'UN MÉTA-PARAMÈTRE POUR L'ESTIMATION DE
LA CAPACITÉ ANTIOXYDANTE GLOBALE DES THÉS, TISANES ET JUS

MAI 2016

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Avant toute chose, je remercie le Dieu tout puissant pour m'avoir donné la force pour accomplir ce travail.

Je voudrais tout d'abord adresser toute ma gratitude à mon directeur de recherche, le Dr. Guy Samson, qui m'a accompagnée tout au long de ma formation. Sa disponibilité et ses généreux secours au cours de mes moments difficiles ont été d'immense réconfort. Merci infiniment.

Je désire remercier mon codirecteur, le Dr Benoit Daoust, pour sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion ainsi que le Dr Vincent Maire pour les conseils concernant la base de données ainsi que sa grande aide dans les analyses statistiques.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers les amis et collègues qui m'ont apporté leur support moral et intellectuel tout au long de ma démarche en particulier Hnia Yaakoubi et les étudiants de laboratoire de chimie.

Enfin, je tiens à témoigner toute ma gratitude à ma mère Mebarka Nouri à qui je dois tout. Mon mari Anis qui était non seulement mon conjoint, mais aussi mon meilleur ami qui a su supporter mes moments difficiles. Mon père Youcef Tolba et mon cher papinou Mayouf.

Un grand merci à mon oncle Lamdjed Tolba et sa femme Houria pour leur confiance et leur support inestimable sans lesquels je n'aurai pas pu continuer, à tous les membres de ma famille en particulier mon frère Adel, ainsi que toute autre personne qui a aidé de loin ou de près à la réalisation de ce projet.

RÉSUMÉ

Problématique et objectif principal

L'oxygène est une molécule à la fois vitale et potentiellement toxique pour les cellules animales et végétales, pouvant conduire à la production des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) lors d'un stress oxydant. Ces derniers sont dotés de propriétés oxydantes élevées, capables d'affecter les structures cellulaires, y compris les lipides, les protéines des membranes, l'ADN, etc. Pour se protéger contre cet effet toxique de l'oxygène, les organismes ont développé des systèmes de défense avec des composantes enzymatiques et non enzymatiques nommées « antioxydants ».

Considérant l'importance physiologique des antioxydants par leur rôle dans la défense des cellules contre les effets toxiques des DRO chez les plantes ainsi que leur rôle nutritionnel, l'estimation fiable de la capacité antioxydante (CA) d'un aliment ou d'une plante est nécessaire. En effet, une telle mesure permettra une meilleure compréhension des phénomènes de détoxification des DRO *in planta*, ainsi qu'un classement des aliments en terme d'antioxydants, une information complémentaire importante pour juger de leur valeur nutritive.

Cependant, compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle la CA peut être mesurée d'une façon bien précise. Ainsi, lorsque l'on compare les données de la littérature, les valeurs de la capacité antioxydante ne s'accordent pas entre elles. On ne peut pas donc les comparer ou donner un classement quantifié ou encore recommander des antioxydants spécifiques.

Par conséquent, ce projet de maîtrise a été réalisé afin de proposer un méta-paramètre de mesure de capacité antioxydante globale, déterminé à partir d'analyses multivariées des composantes principales (ACP) et de régression multiple pas-à-pas, qui pourrait estimer adéquatement les différents aspects du pouvoir antioxydant des thés, tisanes et des jus.

Méthodologies

Pour répondre à nos objectifs de recherche, les capacités antioxydantes de 52 breuvages (thés, tisanes et jus) ont été mesurées en utilisant 6 méthodes les plus usitées et potentiellement complémentaires dans notre première partie expérimentale. Ces méthodes peuvent être divisées en deux catégories suivant les réactions d'oxydo-réduction impliquées, la première comprend les méthodes basées sur le transfert d'électron (SET) soit : 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate) (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Ferric reducing antioxidant power (FRAP), Folin-Ciocalteu. La seconde inclut les méthodes basées sur le transfert d'atome

d'hydrogène (HAT) soit : Oxygen radical absorbance capacity rouge pyrogallol et peroxydation lipidique (ORAC).

Pour tenter d'identifier les principaux facteurs contribuant à la variation des valeurs de la capacité antioxydante selon les échantillons et les méthodes utilisées, nous avons effectué dans notre deuxième partie expérimentale une analyse en composantes principales (ACP). À partir des résultats de cette analyse, un méta-paramètre global de la CA, nous avons dans un premier temps créé un indice virtuel (Y'). Cet indice Y' a été calculé pour chaque échantillon à partir, d'une part de ses coefficients pour les composantes 1 et 2, et d'autre part du pourcentage de la variance expliquée par chaque axe (chaque composante). Puis, le méta-paramètre pour la mesure de la capacité antioxydante globale a pu être calculé en utilisant l'indice virtuel (Y') et les valeurs réelles (mesurées) des CA des breuvages, par une régression linéaire multiple pas à pas.

Résultats

Dans notre première partie de projet, les capacités antioxydantes d'une variété de 52 breuvages (thés, tisanes et jus) ont été évaluées en utilisant 6 méthodes différentes. Nos résultats démontrent des grandes variations entre les divers thés, où les thés noirs et verts sont les meilleurs breuvages. Le classement entre les différents types de breuvages varie selon la méthode appliquée. Un tel classement est intéressant, mais dépend de nos échantillons et ne peut pas être généralisé. En fait, les valeurs de la CA sont fortement liées à la concentration des breuvages en antioxydants, en particulier les polyphénols.

Dans la deuxième partie de notre projet où des analyses statistiques ont été effectuées, la matrice de corrélations montre que les méthodes utilisant le même mécanisme d'oxydo-réduction (HAT ou SET) sont bien corrélées. En effet, des coefficients de corrélation hautement significatifs ($R^2 \geq 0,8$) ont été observés entre les valeurs obtenues par les méthodes SET : Folin-Ciocalteu, ABTS, FRAP et DPPH. Les deux méthodes HAT (ORAC rouge pyrogallol et peroxydation lipidique) sont aussi bien corrélées ($R^2 = 0,75$), mais pas avec les autres méthodes SET ($R^2 \leq 0,5$). Ces résultats suggèrent une complémentarité entre les méthodes SET et HAT, et donc aucune de ces méthodes ne suffirait à elle seule pour estimer adéquatement les différents aspects de la CA d'un échantillon.

Ensuite, l'analyse en composantes principales (ACP) permet d'expliquer 92,2 % de la variance initiale des différentes valeurs, dont 84,9 % par la composante principale 1 (axe horizontal), et 6,64 % par la composante principale 2 (axe vertical). De même, l'ACP a permis de visualiser la répartition des valeurs de CA des différents échantillons qui se présentent sous forme de points, en fonction des composantes 1 et 2. En se déplaçant sur l'axe 1, on remarque que les différents types des breuvages sont distribués selon le même ordre croissant de la CA de ces différents types, soit les tisanes à la gauche (valeurs négatives), puis les jus, les thés blancs et Oolong, et enfin les thés verts et noirs à la droite de l'axe 1 (valeurs positives). Quant à l'axe 2, toutes les tisanes se situent dans la partie inférieure (valeurs négatives), alors que tous les jus se trouvent sans exception

dans la partie supérieure (valeurs positives). Pour les valeurs des autres types de breuvages, elles sont distribuées indépendamment de l'axe 2.

En ce qui concerne les méthodes, elles se présentent sous forme de vecteurs, tous orientés du côté positif de l'axe de la composante principale 1. Donc les méthodes sont toutes positivement corrélées et donnent globalement la même information. Ceci suggère que cet axe représente la concentration de métabolites antioxydants d'un échantillon. Quant à la disposition des vecteurs par rapport à l'axe 2, les quatre vecteurs des méthodes de types SET sont orientés dans la partie positive de l'axe 2, en opposition à ceux des méthodes HAT, qui se trouvent dans la partie négative de l'axe 2. Par conséquent, l'axe 2 représente le type de réaction d'oxydo-réduction impliqué dans le dosage de la CA : transfert d'un électron ou d'un atome d'hydrogène.

Enfin, en utilisant les résultats de l'ACP, un méta-paramètre de CA a été calculé par une régression linéaire pas à pas. Seulement deux méthodes ont été retenues dans le modèle pour tenir compte des différents aspects de la CA, soit une méthode SET (Folin-Ciocalteu) et une méthode HAT (ORAC-rouge pyrogallol). Ce méta-paramètre peut être utilisé pour exprimer plus adéquatement la CA de différent type de breuvages (thés, tisanes et jus), même ceux qui ne figurent pas dans notre liste d'échantillons.

Conclusion et implications

Les résultats de la matrice des corrélations et de l'ACP démontrent que les 6 méthodes usitées dans ce projet peuvent être utilisées pour estimer la CA des breuvages. Cependant, à cause de différents aspects de la CA qui est déterminée par deux principaux facteurs, c.-à-d. la concentration en antioxydants et le type de réactions d'oxydo-réduction impliqué, une seule méthode ne suffit pas pour l'exprimer adéquatement. Par conséquent, l'utilisation d'une méthode complémentaire donne une meilleure estimation de la CA. Ainsi, notre méta-paramètre de CA globale calculé à partir de deux méthodes Folin-Ciocalteu (SET), ORAC-rouge pyrogallol (HAT) peut être utilisé pour exprimer adéquatement la CA de différents types de breuvages (thés, tisanes et jus).

Ce méta-paramètre représente un protocole méthodologique simple, précis et peu coûteux pour estimer globalement la CA. De plus, il va permettre de réduire le temps au laboratoire, fournir des comparaisons significatives des résultats de recherches similaires ainsi qu'un classement fiable des aliments antioxydants ou produits commerciaux.

Mots-clés : Dérivés réactifs de l'oxygène (DRO), capacité antioxydante (CA), ABTS, DPPH, FRAP, Folin-Ciocalteu, ORAC, analyse en composantes principales (ACP), méta-paramètre pour la mesure de la CA globale.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ.....	iii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xi
CHAPITRE I	
INTRODUCTION GENERALE	1
1.1 Problématique générale et justification de ce projet de maîtrise	1
CHAPITRE II	
REVUE DE LITTÉRATURE	9
2.1 Les principaux types de DRO.....	9
2.2 Sites de production des DRO.....	12
2.3 Détoxification des DRO	16
2.3.1 Composantes enzymatiques.....	16
2.3.1.1 Les superoxydes dismutases.....	16
2.3.1.2 Les catalases	17
2.3.1.3 Les peroxydases.....	18
2.3.2 Composantes non-enzymatiques.....	19
2.3.2.1 L'ascorbate ou vitamine C.....	19
2.3.2.2 Vitamine E (Tocophérols)	20
2.3.2.3 Le glutathion.....	21
2.3.2.4 Les caroténoïdes	21
2.3.2.5 Les oligoéléments	22
2.3.2.6 Les polyphénols.....	23
2.3.2.7 Autres antioxydants	26
2.3.3 Systèmes de détoxification des DRO.....	27

2.4	Différentes méthodes de mesure de capacité-antioxydante.....	29
2.4.1	Méthodes utilisant les mécanismes de transfert d'électron (SET).....	31
2.4.1.1	TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) avec ABTS...	31
2.4.1.2	TEAC avec DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)	33
2.4.1.3	FRAP (Ferric reducing antioxidant power)	34
2.4.1.4	Folin-Ciocalteu	35
2.4.2	Méthodes utilisant les mécanismes de transfert d'hydrogène (HAT).....	36
2.4.2.1	Les méthodes ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)...	36
2.5	Pourquoi a-t-on besoin de posséder un outil clair pour l'estimation de la CA globale?.....	39
2.6	Analyses statistiques : analyse en composantes principales.....	42
2.7	Description des échantillons	44
2.8	Objectifs.....	49
CHAPITRE III		
MATÉRIELS ET MÉTHODES		50
3.1	Origines des échantillons.....	50
3.2	Préparation des infusions.....	50
3.3	Séparation des phases aqueuses et organiques des jus	50
3.4	Méthodes de dosages de la capacité antioxydante.....	51
3.4.1	ABTS	51
3.4.2	DPPH	52
3.4.3	FRAP (Ferric reducing antioxidant power)	52
3.4.4	Folin-Ciocalteu	53
3.4.5	ORAC rouge pyrogallol (ORAC-RG)	53
3.4.6	ORAC Peroxydation lipidique (ORAC-PL)	54
3.5	Analyses statistiques.....	54
CHAPITRE IV		
RÉSULTATS.....		56
4.1	Mesures de la capacité antioxydante des thés, tisanes et jus	56
4.2	Matrice de corrélations entre les méthodes de la capacité antioxydante.....	62
4.3	Analyse en composantes principales	63
4.4	Analyse en régression linéaire multiple.....	66

CHAPITRE V

DISCUSSION ET CONCLUSION.....	71
5.1 Mesure de la capacité-antioxydante des thés, tisanes et jus	72
5.2 Analyse en composantes principales	78
5.3 Analyse en régression linéaire multiple pas à pas	81
5.4 Conclusion	82
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	85

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
2.1 Méthodes de mesure de CA <i>in vitro</i> (Huang <i>et al.</i> , 2005)	31
2.2 Quelques études de mesure de CA d'une variété d'échantillons	41
4.1 Les valeurs de CA des différents échantillons pour les 6 méthodes utilisées	58
4.2 Moyenne de la CA de différentes catégories de breuvages pour les 6 méthodes utilisées	62
4.3 Classement des moyennes de différentes catégories pour les 6 méthodes utilisées	62
4.4 Matrice des coefficients de corrélation R^2 entre les valeurs provenant des six différentes méthodes d'estimation de la CA	63
4.5 Classement de la CA de différents échantillons calculée avec le méta- paramètre de mesure de CA global	68
4.6 Classements des moyennes de la CA des catégories des échantillons selon le méta-paramètre de mesure de CA global	70

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
2.1	Génération des DRO (A) dans la membrane interne des mitochondries des plantes (B) et la membrane des thylakoïdes des chloroplastes (Rinalducci <i>et al.</i> , 2008).....	15
2.2	(a) Squelette typique des flavonoides, (b) catéchines (Dixon et Paiva, 1995), (c) flavones (Yamasaki <i>et al.</i> , 2007; Kilmartin et Hsu, 2003; Dixon et Paiva, 1995)	24
2.3	La CA de 112 plantes médicinales chinoises en fonction de leur concentration en polyphénols solubles (DW = masse sèche) (Cai <i>et al.</i> , 2004)	25
2.4	Mécanisme de détoxification des DRO au niveau des mitochondries.....	27
2.5	Cycle Halliwell-Asada de détoxification du superoxyde par l'ascorbate peroxydase (Davey <i>et al.</i> , 2000)	28
2.6	Oxydo-réduction de l'ABTS en ABTS ^{•+} (Christopher <i>et al.</i> , 2014).....	32
2.7	Le radical DPPH et sa forme réduite (Agatonovic-Kustrin <i>et al.</i> , 2014).....	34
2.8	Réaction de la méthode FRAP (Prior <i>et al.</i> , 2005)	35
2.9	Génération de radicaux peroxydes à partir de l'AAPH	37
2.10	Exemple de courbes cinétiques de dégradation de RP en présence (o) et en absence (●) du vin rouge (A/A ₀ : absorbance dans le temps/temps 0) (Alarcon -Lopez <i>et al.</i> , 2011).....	38
4.1	Plan factoriel de l'ACP effectuée sur les valeurs de capacité antioxydante de 52 échantillons (thés, tisanes et jus) estimées par 6 méthodes différentes	65

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AAPH	2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride
Abs	Absorbance
ABTS	2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate)
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
AUC	Area-under-curve
CA	Capacité antioxydante
CAT	Catalase
CO ₂	Dioxyde de carbone
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
GSH/GSSG	Glutathion réduit/oxydé
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HAT	Hydrogen atom transfer
HORAC	Assay Hydroxyl radical antioxidant capacity
NADP+	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
O ₂ ⁻	Anion superoxide
¹ O ₂	Oxygène singulet
OH-	Ion hydroxide
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
SET	Single electron transfer
SOD	Superoxyde dismutase

TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TRAP	Total radical-trapping antioxidant parameter
Trolox	6-hydroxyl-2, 5, 7, 8,-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
vPX	Guaiacol peroxidase

CHAPITRE I

INTRODUCTION GENERALE

1.1 Problématique générale et justification de ce projet de maîtrise

Il y a environ 2,5 milliards d'années, lors du passage de l'Archéen vers le Protérozoïque, l'apparition de la photosynthèse oxygénique par les cyanobactéries a entraîné un bouleversement écologique majeur, la « Grande Oxydation ». En absorbant le CO_2 de l'atmosphère et en y rejetant des quantités équivalentes d' O_2 , ces organismes photosynthétiques ont transformé la chimie de l'environnement terrestre, passant d'un milieu réducteur à un milieu oxydant. L' O_2 qui était alors pratiquement absent sur Terre est passé de 0 à 5 % environ en 500 millions d'années. Une telle transformation a provoqué une crise écologique en raison de la toxicité de l' O_2 pour les organismes anaérobies de l'époque qui le produisaient (Lovelock, 1990). Plus tard, la colonisation des milieux terrestres il y a 500 millions d'années a augmenté la concentration de l' O_2 à son niveau actuel de 21 %. Ainsi, la vie aérobie qui domine maintenant la vie sur Terre est le résultat de l'adaptation de la vie primitive (anaérobie) à un environnement qu'elle avait rendue toxique (Barghoorn et Tyler, 1965).

Les concentrations actuelles d' O_2 et de CO_2 qui sont 20,95 % et 0,04 % respectivement, demeurent relativement stables malgré des flux annuels de plus de 100 Gt an^{-1} CO_2/O_2 entre la biosphère et l'atmosphère (Lambers *et al.*, 1998; Fowler *et al.*, 2009). Un tel équilibre dynamique est possible grâce à la complémentarité entre la photosynthèse et la respiration oxygénique impliquant toutes deux une série de réactions d'oxydo-réduction (chaînes de transport d'électrons). Tandis que la photosynthèse transforme l'énergie lumineuse en énergie stable sous forme de glucides réducteurs tout en libérant de l' O_2 , la respiration libère selon les besoins cellulaires cette énergie des glucides en utilisant l' O_2 comme oxydant, c.-à-d. comme accepteur terminal d'électrons.

Bien que l'O₂ représente une molécule vitale pour tous les organismes aérobiques, l'adaptation à un environnement aérobique n'est pas parfaite, car l'O₂ peut aussi s'avérer toxique : c'est le fameux paradoxe de l'oxygène (Long *et al.*, 1994). En effet, l'O₂ peut interagir avec les réactions métaboliques cellulaires, notamment avec les chaînes de transport d'électrons de la photosynthèse et de la respiration, et conduire ainsi à la formation des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO). Ces derniers peuvent altérer les composantes cellulaires et induire la mort cellulaire (apoptose et nécrose).

Les DRO sont hautement réactifs, avec un potentiel oxydant élevé dû à leur structure électronique. La plupart d'entre eux sont des radicaux libres, à savoir qu'ils possèdent sur leur couche externe un électron non apparié. Pour devenir plus stables, ils ont tendance à compléter leur couche externe, en arrachant des électrons à d'autres molécules (Halliwell et Gutteridge, 2000). Ces DRO incluent les radicaux libres de l'oxygène proprement dit (comme le radical superoxyde (O₂•⁻), radical hydroxyle (OH•)), et certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante (comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), peroxydinitrite (ONOO⁻)) (Novelli, 1997) (voir section 2.1).

À cause de leurs propriétés oxydantes, les DRO peuvent affecter les structures cellulaires, y compris les lipides, les protéines des membranes ainsi que l'ADN. C'est pour cette raison qu'on leur attribue un grand rôle dans la physiopathologie comme les maladies neurodégénératives, notamment l'Alzheimer et le Parkinson, les maladies cardiovasculaires et le cancer (Dalle-Donne *et al.*, 2006; Dhalla et Temsah, 2000). Toutefois, il est actuellement admis que la toxicité des DRO est une question de dose et qu'ils sont bénéfiques à faible concentration. En effet, ils jouent le rôle de messagers secondaires impliqués dans l'expression et la régulation des fonctions de prolifération et d'apoptose (Curtin *et al.*, 2002; Owuor et Kong, 2002).

La production de DRO par les organismes aérobiques est inévitable, surtout dans les mitochondries, les chloroplastes et les peroxysomes (Dal Corso *et al.*, 2008). Leur production augmente lors de conditions de stress physiologiques et

environnementaux. Par exemple lors d'un stress hydrique ou de basses températures, l'incapacité du cycle de Calvin à régénérer l'accepteur terminal d'électrons NADP^+ cause la réduction (saturation) de la chaîne photosynthétique d'électrons, augmentant ainsi la probabilité que les électrons passent à l' O_2 (formation de DRO) présent à de hautes concentrations dans les chloroplastes. Au niveau des mitochondries, une augmentation du taux de respiration pour répondre aux besoins cellulaires élevés en condition de stress augmente aussi le risque de la réduction mono électrique (c.-à-d. l'addition d'un seul électron) de l' O_2 au niveau de l'ubiquinone, un transporteur non protéique de la chaîne de transport des électrons, conduisant ainsi à une plus grande formation des DRO.

Pour se protéger contre les effets délétères d'un excès de DRO, les organismes aérobiques se sont adaptés en développant des systèmes de détoxification des DRO, impliquant des composantes enzymatiques et non enzymatiques « les antioxydants ». Ces derniers sont définis par Halliwell (1999), comme « toute substance qui en faible concentration par rapport au substrat susceptible d'être oxydé prévient ou ralentit l'oxydation de ce substrat ». Ce sont donc des molécules réductrices qui donnent un ou plusieurs électrons aux DRO.

En situation physiologique, ces systèmes antioxydants ont la capacité de maintenir la concentration des DRO à un niveau optimal pour la cellule. Un stress oxydant survient lorsqu'il y aura un déséquilibre dans cette balance DRO/antioxydants en faveur des DRO (Sies, 1991). Les antioxydants par leur rôle de détoxification des DRO peuvent donc diminuer les dommages causés par ces derniers et ainsi avoir des effets bénéfiques pour le fonctionnement aux niveaux tant cellulaire qu'organismal.

Depuis plus d'une vingtaine d'années, les antioxydants, principalement les polyphénols, l'acide ascorbique et les caroténoïdes, suscitent un intérêt grandissant pour leur rôle dans la résistance des végétaux et animaux aux stress environnementaux. Mais surtout, l'intérêt généralisé pour les antioxydants s'explique par leurs effets bénéfiques sur la santé humaine. Maintes études ont constaté que l'incidence réduite de certains cancers et maladies coronariennes allait de pair avec une diète riche en fruits,

légumes et herbes (Berger, 2006). Or, ces effets positifs reposent en grande partie sur les antioxydants présents dans les végétaux que nous consommons.

Les principaux antioxydants d'origine végétale sont les polyphénols. Ceux-ci représentent plus de 8000 structures présentes dans tous les organes de la plante (Lugasi, 2003), et certains, dont la quercétine et les catéchines, ont un pouvoir antioxydant supérieur à celui de l'acide ascorbique sur une base molaire (Rice-Evans, 2001). D'ailleurs, d'après la littérature une alimentation riche en polyphénols peut diminuer de 68 % des maladies cardiovasculaires chez l'humain (Hertog *et al.*, 1993). De plus, certains chercheurs ont observé une augmentation de la capacité antioxydante du plasma suivant la prise de boissons riches en polyphénols telles que le thé (Leenen *et al.*, 2000), le vin (Fuhrman *et al.*, 1995; Serafini *et al.*, 2000), la bière ainsi que les fruits et les légumes riches en polyphénols (Cao *et al.*, 1998). Les polyphénols sont également connus comme des chélateurs de métaux, comme le fer et le cuivre qui sont des ions essentiels pour nombreuses fonctions physiologiques, mais peuvent être responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction de Fenton (voir section 2.1). Or, les polyphénols vont se lier à des métaux chargés électriquement pour former un complexe non toxique pour la cellule (Pietta, 2000).

En plus de leurs effets bénéfiques sur la santé humaine, les polyphénols pourraient jouer un rôle essentiel dans la protection des végétaux contre les effets néfastes des DRO. En effet, la concentration en polyphénols dans les tissus végétaux augmente lors de nombreux stress oxydant comme un excès de radiations lumineuses, de basses températures ou des carences nutritives (Dixon et Paiva, 1995). Cependant, leur accumulation s'observe surtout dans les vacuoles des cellules épidermiques, donc loin des principaux sites de production de DRO (Dixon et Paiva, 1995). Toutefois, il semble que cette localisation ne serait pas une contrainte au processus de détoxification, car certains DRO comme le peroxyde d'hydrogène ont une longue durée de vie et pourraient ainsi diffuser pour rejoindre les polyphénols jusqu'à l'épiderme où ils seraient détoxifiés (Yamasaki *et al.*, 1997).

Non seulement les polyphénols peuvent réduire les DRO en jouant le rôle d'antioxydants (Takahama, 2004), mais ils peuvent aussi induire des enzymes antioxydants comme la superoxyde dismutase et la catalase qui décomposent l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène tous deux des DRO très toxiques pour les cellules (Du *et al.*, 2007) (voir section 2.1).

Considérant d'une part le rôle bénéfique des antioxydants sur la santé humaine, et d'autre part leur importance physiologique dans la défense des plantes contre les stress oxydants, l'estimation adéquate de la capacité antioxydante d'un tissu ou produit végétal (aliment ou non) devient une nécessité. L'estimation fiable de la capacité antioxydante est nécessaire pour permettre une meilleure compréhension des phénomènes de détoxification des DRO *in planta*, ainsi qu'un classement des aliments en terme d'antioxydants, une information complémentaire importante pour juger de leur valeur nutritive.

À cause de la complexité des processus d'oxydo-réduction impliqués et la nature diversifiée à la fois des DRO et des antioxydants (voir sections suivantes), il n'y a pas de méthode universelle par laquelle la capacité antioxydante (CA) peut être estimée d'une façon précise. Plutôt, il existe une multitude de méthodes et de molécules de référence, ce qui complique grandement la comparaison des valeurs de CA trouvées dans la littérature, d'autant plus que ces méthodes reposent sur différents mécanismes chimiques (un transfert d'électron « suivi d'un transfert de proton » ou un transfert d'atome d'hydrogène). Ainsi, l'utilisation d'une seule méthode pour évaluer la CA est insuffisante pour prendre en compte les différents aspects de la CA (Huang *et al.*, 2005; Antolovich *et al.*, 2002; Frankel et Meyer, 2000; Marc *et al.*, 2004).

Mais quelles méthodes choisir, et comment éviter la redondance entre celles-ci? Dans une première tentative pour répondre à ces questions, le « First International Congress on Antioxidant Method » fut organisé en 2004. Suite aux délibérations de ce congrès, il fut recommandé pour des raisons à la fois théoriques et pratiques de caractériser la CA à l'aide de trois méthodes : Oxygen radical absorbance capacity

ORAC (sans préciser avec quelle molécule cible), Folin-Ciocalteu et Trolox équivalent antioxidant capacity (TEAC). Ces méthodes ont été choisies en raison de leur rapidité, simplicité ainsi que leur adaptabilité pour la mesure de la CA des antioxydants hydrophile et hydrophobes à la fois (Prior *et al.*, 2005). De plus la méthode ORAC peut refléter l'action *in vivo* (Prior *et al.*, 2005). En 2005, Prior et ses collaborateurs présentèrent les avantages et les inconvénients de ces méthodes, ainsi que des méthodes alternatives.

Un examen de la littérature indique que ces recommandations demeurent peu suivies. La plupart des études recensées dans le cadre de ce projet de maîtrise présentent simplement les valeurs de CA d'une large gamme de produits (fruits, légumes, breuvages, huiles, vins) estimées par différentes méthodes, comparant les CA des échantillons pour une seule méthode à la fois, par exemple en établissant un classement du CA de chaque produit pour chaque méthode utilisée (voir section 2.6). Ainsi aucune comparaison ne peut être faite entre les différentes mesures, les comparaisons étant essentiellement faites à partir des rangs des échantillons entre eux (Prior *et al.*, 2005).

Donc, la question demeure entière : comment combiner les valeurs de CA obtenues par différentes méthodes pour exprimer adéquatement la CA globale d'un produit? À notre connaissance, une seule étude a tenté de répondre à cette question en proposant un indice global de la CA à une variété de 34 breuvages commerciaux vendus aux États-Unis réputés pour être parmi les plus antioxydants (Seeram *et al.*, 2008). Ces auteurs ont utilisé quatre méthodes de dosage de la CA : TEAC avec DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), TEAC avec ABTS, FRAP (Ferric reducing antioxidant power) et Oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluoresceine). Ensuite pour chacune des méthodes, les valeurs de chaque échantillon ont été normalisées par rapport à la valeur la plus élevée de cette méthode, et finalement la moyenne des valeurs normalisées des quatre méthodes a été calculée pour chaque échantillon. Quoiqu'intéressant, cet indice global dénoté « antioxidant potency composite index » demeure relatif et donc peu applicable pour deux raisons. Tout d'abord, la valeur CA globale d'un échantillon dépend des valeurs de CA des autres échantillons présents.

De plus, la valeur CA globale calculée dépendait des méthodes utilisées. En effet, certaines méthodes pouvaient être redondantes si elles étaient fortement corrélées, surestimant ainsi l'information qu'elles apportaient au calcul de la CA globale.

Alors comment peut-on estimer la CA globale? Comment peut-on comparer significativement la CA des produits? Comment identifier les méthodes qui sont complémentaires et éviter les méthodes redondantes? Comment combiner une ou plusieurs méthodes pour avoir une CA globale d'un produit végétal? L'estimation de la CA demeure donc ambiguë puisqu'il n'y a pas de méthodes efficaces pouvant tenir compte de la complexité des réactions composant la CA d'un produit végétal.

Dans ce contexte, l'objectif principal de cette maîtrise est de définir un méta-paramètre pouvant estimer globalement les différents aspects de la CA de 52 différents produits végétaux, soit des thés, tisanes et jus. Pour ce faire, j'ai tout d'abord estimé les CA des 52 différents échantillons en utilisant 6 méthodes les plus usitées et potentiellement complémentaires, c.-à-d. TEAC avec ABTS, TEAC avec DPPH, FRAP, Folin-Ciocalteu, ORAC rouge pyrogallol et ORAC-peroxydation lipidique. Ensuite, j'ai effectué pour la première fois sur à notre connaissance une analyse multivariée des composantes principale (ACP) sur la matrice de 52 valeurs de CA \times 6 méthodes ($n = 312$). Une telle analyse permet tout d'abord de projeter l'ensemble des valeurs de CA (52×6) dans un même espace qui maximise les différences entre chaque valeur et les organise le long de nouveaux axes de façon à maximiser leur variance sur des nouveaux axes nommés « composantes principales ». Cette nouvelle représentation géométrique donne des indications sur la nature, la force et la pertinence des liens entre les variables et facilite ainsi leur l'interprétation (Smith, 2002). En utilisant les scores des variables projetés sur les deux principaux composantes ainsi que la contribution relative de ces deux composantes à expliquer la variance, j'ai pu définir en une équation simple un indice global virtuel de CA grâce à une régression pas-à-pas. Cette méthode de régression pas-à-pas consiste à construire un modèle ou une équation de prévision qui permet de trouver le meilleur groupe de méthodes utilisées permettant de prévoir de la manière la plus adéquate la CA de nos échantillons.

En bref, j'ai pu : i) identifier les facteurs qui déterminent et expriment le mieux la CA, soit bien sûr la concentration des antioxydants présents dans les échantillons et aussi le type de réaction d'oxydo-réduction impliquant un transfert d'électron ou un transfert d'atome d'hydrogène). ii) établir une matrice de corrélations entre les méthodes pour identifier celles qui sont complémentaires et éviter les redondantes, iii) calculer un indice virtuel de la CA, utilisé pour le calcul du méta-paramètre de la CA globale, par une régression linéaire multiple pas-à-pas, ne retenant que deux méthodes, soit celles de Folin-Ciocalteu et l'ORAC rouge pyrogallol.

CHAPITRE II

REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Les principaux types de DRO

Les DRO partagent tous la même propriété, ils sont relativement instables. Leur demi-vie est de 10^{-9} à 10^{-6} secondes pour les plus instables et juste quelques dizaines de secondes pour $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 (Tessier et Marconnet, 1995). De plus, ils sont dotés d'une forte réactivité et d'une capacité à produire des réactions en chaîne. En effet, chaque espèce pourra générer à son tour une nouvelle espèce radicalaire, c'est-à-dire que ces molécules ayant perdu un seul électron deviennent radicalaires et peuvent générer une nouvelle réaction en chaîne en arrachant un électron à une autre molécule, entraînant ainsi l'oxydation en chaîne comme la peroxydation lipidique.

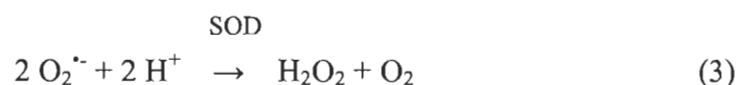
Les DRO regroupent : 1) les dérivés radicalaires (espèces chimiques possédant un électron célibataire non apparié [anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), radical hydroxyle ($HO\cdot$)...]) (Powers et Jackson, 2008), 2) les dérivés non radicalaires (espèces chimiques ne possédant pas d'électron célibataire et dont la toxicité est assez importante [peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), peroxynitrite ($ONOO^-$)..]). Notons que l'oxygène (O_2) est considéré comme un radical, puisqu'il possède deux électrons non appariés, l'addition d'un électron à l'oxygène forme l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) (Miller *et al.*, 1990).

L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est produit principalement dans les mitochondries et les chloroplastes au niveau respectivement de l'ubiquinone (ou coenzyme Q) et du photosystème I. La chaîne de transport d'électrons peut laisser fuir environ 1 % à 3 % d'électrons pour générer l'anion superoxyde au lieu de contribuer à la réduction de l'oxygène en eau ou celle du $NADP^+$ en NADPH (Cadenas et Sies, 1998) (réactions (1)

et (2)). De même, la NADH-déshydrogénase située dans la membrane mitochondriale interne peut conduire à la formation de $O_2^{\bullet -}$ (Griendling *et al.*, 2000).



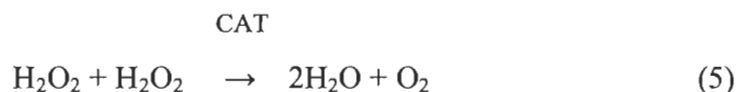
Puisqu'il vit longtemps, le $O_2^{\bullet -}$ a le temps de traverser les membranes biologiques (Mandelker, 2008). Il est éliminé ou tout au moins maintenu à un niveau de concentration assez bas par les enzymes superoxydes dismutases (SOD) par dismutation pour former le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (réaction (3)). Il existe deux types de superoxyde dismutase, l'une est essentiellement localisée dans le cytosol et dont le site actif contient du cuivre et du zinc (Cu,Zn-SOD), alors que l'autre, présente dans les mitochondries, contient du manganèse (Mn-SOD). Notons que le métal dans la SOD n'affecte pas son rôle catalytique, il a plutôt un rôle structural (Bertini *et al.*, 1998).



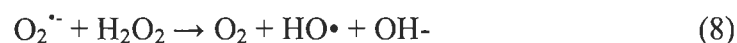
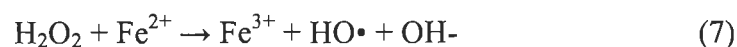
Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ainsi formé est une molécule ayant tous ses électrons périphériques appariés (espèce non radicalaire). Sa production peut également résulter de la réduction bi électronique de l'oxygène (réaction (4)).



Les peroxysomes sont connus pour produire H_2O_2 , toutefois, ces organites contiennent également les catalases (CAT), qui peuvent décomposer le peroxyde d'hydrogène en accélérant sa dismutation en oxygène et en eau (réaction (5)) (Valko *et al.*, 2004).



La toxicité du peroxyde d'hydrogène réside dans sa capacité à réagir avec le fer ou le cuivre ($\text{Fe}^{2+}/\text{Cu}^{+}$) pour générer l'ion hydroxyle (OH^-) et le radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$). Cette réaction est appelée réaction « d'Haber-Weiss » (réaction (8)) (Power et Jackson, 2008). Elle est décomposée en deux étapes, la première est un cycle catalytique qui implique la réduction de l'ion ferrique en fer (réaction (6)). La seconde étape est la « réaction de Fenton » (réaction (7)) (Crichton *et al.* 2002; Dunford, 2002).



L'ion hydroxyle (OH^-) et le radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$) sont deux espèces différentes puisque l'un (OH^-) a tous ses électrons périphériques appariés, tandis que l'autre ($\text{OH}\cdot$) a un électron célibataire sur sa couche périphérique (Valko *et al.*, 2005). Il faut noter que du fait que le radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$) a une constante de vitesse réactionnelle très élevée, il peut initier une peroxydation lipidique en chaîne (Gutteridge, 1995). Le radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$) est le DRO le plus dangereux pour l'organisme (Powers et Jackson, 2008).

L'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ est un autre DRO, en fait, c'est une forme excitée de l'oxygène fondamental. À l'inverse de ce dernier, l' $^1\text{O}_2$ n'est plus radicalaire, car ses deux électrons libres sont appariés. Son origine la plus fréquente semble être la photosensibilisation dans les plantes, qui est la capture d'un photon de lumière par un photo-sensibilisateur (chlorophylle), ce qui provoque son excitation. L'énergie stockée peut être transférée à l'oxygène pour la génération d' $^1\text{O}_2$ (Wassermann et Murray, 1979). En présence de l' $^1\text{O}_2$, l'ADN subit une fragmentation, surtout au niveau de ses bases azotées (Girrotti, 1998) (voir section 2.2).

Il existe d'autres types de DRO qui peuvent être formés dans les systèmes vivants, par exemple citons les radicaux alkyles $\text{R}\cdot$ et les radicaux peroxydes $\text{ROO}\cdot$ (Valko *et al.*,

2006). Leur formation est le résultat de l'action oxydante d' $\text{OH}\cdot$ sur les chaînes d'acides gras polyinsaturés (RH). La réaction comprend deux étapes, la première réaction (9) correspond à la perte d'un d'hydrogène causée par un radical hydroxyle et la seconde (10) à la liaison de $\text{R}\cdot$ avec une molécule d'oxygène (Mc Michael, 2007).



Les radicaux alkyles sont à l'origine des processus d'oxydation en chaîne et en particulier de la peroxydation lipidique (Gutteridge, 1994).

Il est intéressant de mentionner une autre espèce DRO radicalaire qui est l'oxyde nitrique. Ce dernier est un gaz synthétisé à partir d' O_2 et d'un acide aminé (L-arginine) en présence de l'enzyme oxyde nitrique synthase (NOS) (Ghafourifar et Cadenas, 2005). Il est soluble à la fois dans les milieux aqueux et lipidiques. Aussi, il diffuse facilement à travers le cytoplasme et les membranes plasmiques (Chiueh, 1999) (réaction (11)).



Lorsque l'oxyde nitrique est en trop fortes concentrations, il peut réagir avec l'anion superoxyde pour former le peroxynitrite (ONOO^-), un agent oxydant non radicalaire hautement réactif. Ce dernier peut causer des fragmentations de l'ADN et l'oxydation des lipides nucléiques puisqu'il diffuse facilement à travers les membranes (Carr McCall et Frei, 2000) (réaction (12)).



2.2 Sites de production des DRO

Les chaînes de transport d'électron de la photosynthèse et la respiration cellulaire semblent être les générateurs principaux des DRO au niveau cellulaire. Ils sont souvent

formés de la réduction partielle de l'oxygène issue de la fuite d'électrons au niveau des chaînes de transport d'électrons. De même, chez les végétaux, la photorespiration peut être aussi une source de production des DRO dans le peroxysome (Figure 2.1).

Lors de certains stress environnementaux (basses températures, sécheresse, excès de lumière), la capacité d'assimilation du CO_2 va diminuer, menant à un flux d'électrons supérieur à la capacité d'assimilation de la photosynthèse. Les transporteurs d'électrons se retrouvent alors dans un état réduit et la chaîne photosynthétique devient saturée. En effet, dans les chloroplastes, les DRO peuvent être issus de la réduction directe par le photosystème I (PSI) et la ferrédoxine (réaction de Mehler) ou au niveau du photosystème II (PSII) (Apel et Hirt, 2004). Au niveau du PSI, lors de passage d'électrons entre la ferrédoxine du PSI et le NADP^+ , une fraction peut réagir avec l' O_2 pour former des anions superoxydes qui seront en partie transformés en peroxyde d'hydrogène par les superoxydes dismutases. Ces deux formes de DRO sont très toxiques pour la cellule parce qu'elles pourront interagir entre elles pour former des radicaux hydroxyles très réactifs (Michiels *et al.*, 1994).

Lors d'un stress oxydant, au niveau du photosystème II (PSII), la réduction de la plastoquinone A (Q_A) du PSII se fait plus rapidement que son oxydation par la plastoquinone B (Q_B). Les Q_A et les phéophytines ne peuvent plus alors être réoxydés étant donné la limitation du transport d'électrons en amont. Dans ce cas, les chlorophylles demeurant sous forme excitée dit état triplet, vont éventuellement réagir avec l'oxygène pour former de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$). Ce phénomène se produit principalement lors d'un excès de lumière. Ceci qui provoque l'inactivation du centre réactionnel du PSII menant à sa dégradation, processus appelé photoinhibition (Wassermann et Murray, 1979).

Lors de la respiration cellulaire dans les mitochondries, la majeure partie de l'oxygène subit une réduction tétravalente (addition de quatre électrons) conduisant ainsi à la production d'eau. Cette réaction est catalysée par le cytochrome oxydase, accepteur terminal d'électrons présents dans le complexe IV de la chaîne mitochondriale de

transport des électrons. Cependant, lorsque le taux respiratoire augmente pour satisfaire les besoins métaboliques des cellules sous conditions de stress environnementaux, une proportion de l'oxygène (1 à 3 %) peut échapper à la réduction complète et subir ainsi une réduction mono-électronique (gain d'un électron) au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire, pour produire l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ qui sera transformé en peroxyde d'hydrogène en présence de superoxyde dismutase (SOD) (Del Rio *et al.*, 2002; Oracz *et al.*, 2007).

Il est intéressant de mentionner que chez les cellules photosynthétiques, la production des DRO au niveau des mitochondries est plus importante à l'obscurité par rapport à leur production à la lumière (Noctor *et al.*, 2007). La faible quantité de DRO produite à la lumière peut être expliquée par la présence de l'enzyme alternative oxydase (AOX) qui fournit une autre voie pour les électrons passant à travers la chaîne de transport d'électrons pour réduire l'oxygène (Maxwell *et al.*, 1999).

La figure 2.1 montre la génération des DRO lors d'un stress oxydant : (A) au niveau des mitochondries, la réduction de l' O_2 (gain d'un électron) au niveau de complexe I et II mène à la production de l'anion superoxyde (B) dans les chloroplastes, la réduction de l' O_2 au niveau de la ferrédoxine du PSI conduit à la formation de l'anion superoxyde. Le transfert d'énergie d'excitation à partir de chlorophylles excités à l'oxygène dans les complexes de récolte de lumière au niveau de PS II conduit à la formation de 1O_2 .

En ce qui concerne les peroxysomes, vésicules cytoplasmiques contenant des enzymes puissantes (peroxydases et catalases), elles ont pour rôle majeur la protection de la cellule contre les effets néfastes du peroxyde d'hydrogène qui sera converti par la catalase en oxygène et eau (Del Rio *et al.*, 2006).

Selon Parent et ses collaborateurs (2008), les chloroplastes et les peroxysomes sont des détecteurs de changements environnementaux. La production des DRO à leur niveau joue un rôle dans la régulation d'expression spécifique de la réponse au stress. En effet,

la réponse des plantes aux changements environnementaux dépend de la concentration cellulaire en DRO. Dès que cette concentration dépasse un certain seuil, celle-ci va servir comme signal pour stimuler et réguler l'expression de gènes de défense et mener ainsi à l'acclimatation de la plante aux conditions de stress (Zago *et al.*, 2006). Par exemple, lors d'une photoinhibition, la carboxylation du ribulose 1,5-biphosphate est aussi inhibée. Cela entraîne la production de phosphoglycolate va être transporté vers le peroxyosome où il est transformé en glyoxylate par l'enzyme glycolate oxydase; formant ainsi le peroxyde d'hydrogène. Cette production de peroxyde d'hydrogène agit comme signe pour stimuler la réponse à la photoinhibition (Parent *et al.*, 2008).

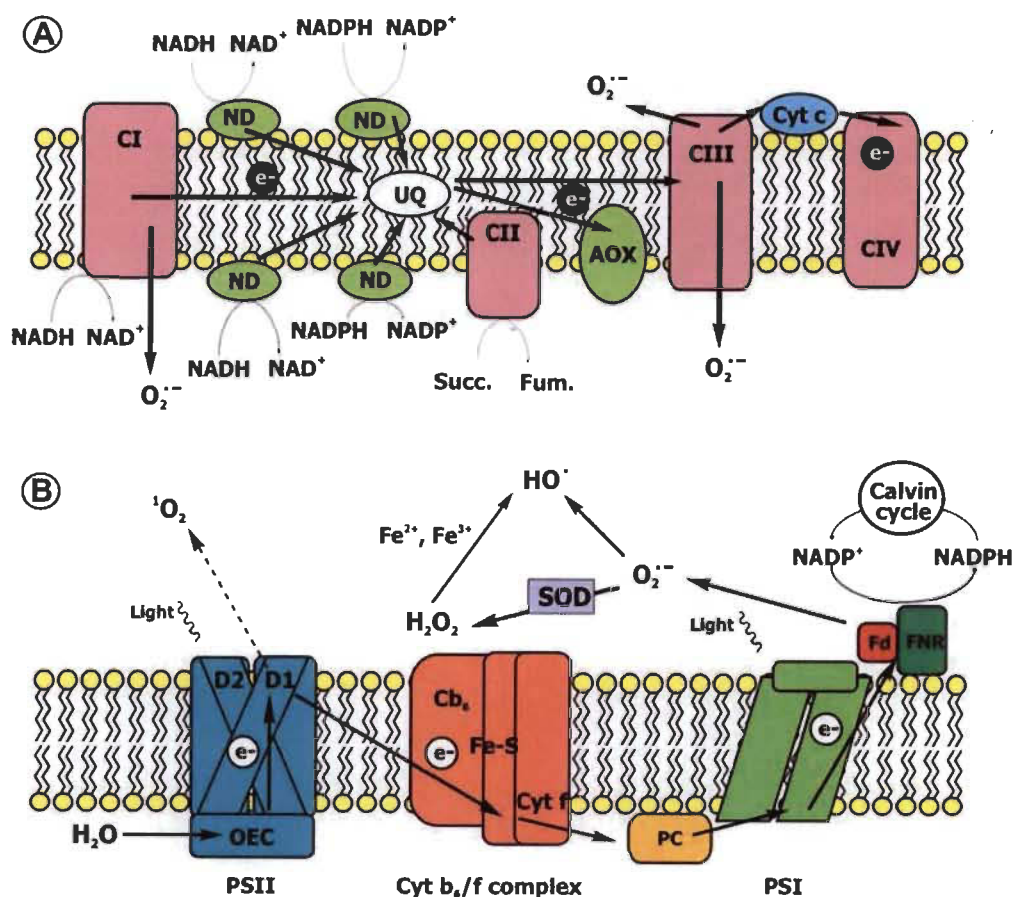


Figure 2.1 Génération des DRO (A) dans la membrane interne des mitochondries des plantes (B) et la membrane des thylakoïdes des chloroplastes (Rinalducci *et al.*, 2008).

2.3 Détoxification des DRO

Les DRO sont produits spontanément et de manière continue au sein des cellules. Le maintien d'un niveau non cytotoxique des DRO est assuré par des systèmes antioxydants. En effet, à l'état physiologique normal, le taux de production de DRO est inférieur à la capacité de détoxification des systèmes de défense. Cependant, lors d'un stress oxydant la génération des DRO dépasse la capacité de détoxification des antioxydants, ce qui peut entraîner à des fortes doses des dommages cellulaires et même l'activation du processus de mort cellulaire programmée (apoptose) ou non (nécrose).

Les systèmes de défense de l'organisme contre l'activité des DRO sont multiples et complexes. Ils comprennent des composantes enzymatiques telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX), ainsi que des composantes non-enzymatiques telles que le glutathion, la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes et l'acide urique. Ces molécules agissent ensemble dans des systèmes de détoxification et neutralisation des DRO tel que le cycle ascorbate-glutathion. Ce cycle ascorbate-glutathion est un élément de détoxification contre le H_2O_2 généré dans différents compartiments cellulaires. Sa présence a été signalée dans les chloroplastes, les mitochondries, les peroxysomes, et le cytoplasme (Noctor et Foyer, 1998; Asada, 2000). Avant de voir les systèmes, on peut citer les différentes composantes enzymatiques et non enzymatiques.

2.3.1 Composantes enzymatiques

2.3.1.1 Les superoxydes dismutases

Les superoxydes dismutases (SOD) sont une classe de métallo enzymes qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en H_2O_2 (voir section 2.1, réaction 3). Elles sont présentes dans les chloroplastes, les mitochondries, les peroxysomes, et le cytoplasme. Les chloroplastes contiennent essentiellement les isoformes CuZn-SOD et Fe-SOD, alors que dans les mitochondries, l'isoenzyme Mn-SOD a été clairement localisée (Alscher *et al.*, 2002; Del Río *et al.*, 2002). Dans les peroxysomes, les

isoformes CuZn-SOD et Mn-SOD ont été trouvées sous forme solubles dans la matrice des organelles, ou liées aux membranes dans le cas de Mn-SOD (Del Río *et al.*, 2002).

La SOD élimine ou tout au moins maintient à un niveau de concentration assez bas l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) par dismutation pour former le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

2.3.1.2 Les catalases

Les catalases sont des enzymes majoritairement localisées dans les peroxysomes. Elles catalysent la dismutation du peroxyde d'hydrogène (Arora *et al.*, 2002) (voir section 2.1, réaction 5). Cette dismutation est cruciale pour la cellule étant donné que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) peut entrer en contact avec le fer ou le cuivre pour générer des radicaux hydroxyles (Baker et Graham, 2002; Noctor et Foyer, 1998; Halliwell et Gutteridge, 2000).

On distingue trois types : catalase (dite typique), catalase-peroxidase et manganèse-catalase (dite atypique) (Zâmocky et Roller, 1999; Nordberg et Arner, 2001). Toutefois, ces trois protéines diffèrent significativement au niveau de leur site actif et également en ce qui concerne leur mécanisme d'action (Antoniuk *et al.*, 2000). Cependant, cette classification a été abandonnée et fut remplacée par une classification basée sur les critères phylogénétiques (Mayfield et Duvall, 1996). Une nouvelle classification différencie les catalases monofonctionnelles, les catalases-peroxydases et les catalases non héminiques.

La majorité des catalases font partie de la classe des catalases monofonctionnelles. Cette classe a quatre résidus d'acides aminés (l'histidine, la sérine, la tyrosine et l'asparagine) associés à l'atome de fer de l'hème (Hebrard, 2010). Quant aux catalases-peroxydases sont formées d'une triade d'acides aminés associés à l'atome de fer de l'hème. La dernière classe est les catalases non-héminiques dites à manganèse, comme leur nom indique cette catégorie, possèdent du manganèse à la place d'un hème (Hebrard, 2010).

Il faut noter que lorsque le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) atteint des concentrations supérieures à 100 μM , la catalase peut être inactivée (Ko *et al.*, 2000). De plus, son activité est réduite lors de certaines conditions de stress notamment lors de stress thermiques ou osmotiques (Hertwig *et al.*, 1992).

2.3.1.3 Les peroxydases

Les peroxydases sont des enzymes retrouvées dans les plantes, les animaux et les microorganismes (Colonna *et al.*, 1999). Elles sont des protéines multigéniques divisées en hème ferrique ou non héminique, catalysant la réduction d'un substrat oxydé en utilisant de nombreux co-substrats comme donneurs d'électrons. Le substrat oxydé est le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Delannoy *et al.*, 2004).

Les peroxydases à hème sont divisées en trois classes distinctes (Welinder, 1992). Les peroxydases de la classe I sont intracellulaires et sont de trois types : i) les ascorbates peroxydases (APX) présentes dans tous les compartiments cellulaires des plantes, catalysent la réduction de l'excès de peroxyde d'hydrogène en utilisant l'ascorbate (Asada, 1992); ii) les cytochromes C peroxydases (CCP) sont liées aux mitochondries et elles réduisent le peroxyde d'hydrogène produit lors de la respiration en oxydant le cytochrome C (Erman et Vitello, 2002); iii) les catalases peroxydases (CP) jouent le rôle de catalases en transformant le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène (Obinger *et al.*, 1999).

Les peroxydases de la classe II sont capables d'oxyder des molécules à potentiel redox très grand notamment la lignine (Gold et Alic, 1993). On trouve dans cette classe : i) les lignines peroxydases (LiP) qui, contrairement aux autres peroxydases, sont capables d'oxyder directement leurs substrats, principalement les dérivées de lignine non phénoliques et de nombreux composés phénoliques, et ne requièrent pas la participation des cofacteurs vu leurs potentiels redox élevés (Poulos *et al.*, 1993); ii) les manganèses peroxydases relâchent des ions Mn^{3+} qui, à leur tour, oxydent des molécules à hauts potentiels redox tels que les simples phénols, les sous-structures phénoliques de lignine

(Gold et Alic, 1993); iii) les peroxydases dites « versatiles » (VP) sont non seulement capable d'oxyder Mn (II) en Mn(III) comme avec les manganèses peroxydases, mais aussi des substrats phénoliques et non phénoliques qui sont typiques des peroxydases de lignine (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2001).

Les peroxydases de classe III qui sont typiques des plantes vertes (Penel *et al.*, 2004). Cette classe contient un grand nombre d'isoformes qui peuvent oxyder nombreuses molécules, d'où la difficulté de préciser le rôle de chacune, De plus, outre leur fonction de détoxification des DRO, elles ont d'autres fonctions physiologiques comme la construction de la paroi cellulaire, la synthèse de la lignine, l'hydroxylation des dérivés aromatiques, la défense contre les pathogènes ou la sénescence (Hiraga *et al.*, 2001).

Quant aux peroxydases non héminique, elles sont représentées par la glutathion peroxydase (GPx). C'est une enzyme à sélénium capable de prendre en charge le peroxyde d'hydrogène en oxydant deux glutathions réduits ($\text{GSH} + \text{GSH} \rightarrow \text{GSSG}$) (Nordberg et Amer, 2001). La glutathion peroxydase est présente dans les liquides extracellulaires et dans les cellules au niveau du cytosol et des mitochondries. On en retrouve au moins quatre types, chacune localisée dans des tissus plus ou moins spécifiques; les GPx1 et GPx4 qui sont cytosoliques et abondantes dans la plupart des tissus, la GPx2 qui est dite gastro-intestinale et la GPx3 localisée au niveau des reins (Nordberg et Arner, 2001).

2.3.2 Composantes non-enzymatiques

2.3.2.1 L'ascorbate ou vitamine C

C'est une vitamine hydrosoluble présente dans tous les compartiments cellulaires, ainsi que dans la matrice extracellulaire. Elle est synthétisée par les plantes et la plupart des animaux, excepté chez certains mammifères (comme l'homme). C'est une vitamine essentiellement utilisée au niveau cellulaire comme un donneur d'électrons sous sa

forme ionisée (ascorbate). L'ascorbate se transforme tout d'abord en intermédiaire radicalaire mono-dehydroascorbate puis en ascorbate et déhydroascorbate. Ce dernier dérivé est lui-même immédiatement retransformé en ascorbate par des enzymes réductase ou par réduction chimique par le glutathion (Badenhorst *et al.*, 1998).

L'ascorbate est capable de réagir directement avec l'anion superoxyde et l'oxygène singulet, réduisant ainsi la peroxydation lipidique et les dommages aux protéines et à l'ADN (Foyer et Noctor, 2005). Elle joue également un rôle d'antioxydant indirect en recyclant les caroténoïdes et la vitamine E, permettant ainsi une meilleure efficacité de la peroxydase ascorbate (Nordberg et Arner, 2001). Elle interviendrait également dans la régulation du cycle cellulaire et dans l'extension de la paroi (Horemans *et al.*, 2000).

2.3.2.2 Vitamine E (Tocophérols)

C'est une vitamine liposoluble, qui se localise dans les membranes cellulaires ou dans les transporteurs de lipides répartis dans les différentes lipoprotéines plasmatiques. Elle est produite dans les chloroplastes des plantes, alors que les animaux doivent la procurer dans leur alimentation.

Elle réagit avec les radicaux peroxydes des acides gras en empêchant la formation des nouveaux DRO, réprimant ainsi la propagation de la peroxydation lipidique incitée par ces derniers (Wolf *et al.*, 1998; Nordberg et Arner, 2001). De plus, elle peut piéger les radicaux superoxydes $O_2^{\cdot -}$ et hydroxyde OH^{\cdot} , et stabilise l'oxygène singulet 1O_2 (Mandelker, 2008).

Il existe deux groupes : les α -, β -, γ - et δ -tocophérols et les tocotriénols (Ohrvall *et al.*, 1996). Chacun de ces deux groupes comporte quatre isoformes (α , β , γ , δ) (Wolf *et al.*, 1998). Une fois les tocophérols oxydés en radicaux tocophéryles, ils sont réduits par la suite à leur forme originale par la vitamine C (Nordberg et Arner, 2001; Wolf

et al., 1998). Les radicaux ascorbyles et tocophéryles peuvent aussi être recyclés par le glutathion réduit (GSH) (Nordberg et Arner, 2001; Valko *et al.*, 2007).

2.3.2.3 Le glutathion

Le glutathion est un tripeptide (γ -Glu-Cys-Gly) ubiquitaire chez les organismes aérobies (Nordberg et Arner, 2001). Il représente une composante antioxydante importante, car c'est le substrat de plusieurs enzymes antioxydantes (Halliwell et Gutteridge, 1999). Il peut se retrouver la forme réduite (GSH) ou sous forme oxydée (GSSG).

La concentration en GSH est élevée dans les cellules végétales, et en particulier dans les chloroplastes où elle peut atteindre 5 mM (Noctor *et al.*, 1998). Le GSH peut directement réduire l' H_2O_2 , l'anion superoxyde et le radical hydroxyle (Valko *et al.*, 2007). Il est impliqué aussi dans la régénération de l'ascorbate dans le cycle Halliwell-Asada. (Nordberg et Arner, 2001). De plus, le ratio GSH/GSSG est un bon indicateur du stress oxydant d'un organisme (Jones *et al.*, 2000).

En sus, le glutathion peut jouer de nombreux rôles physiologiques chez les végétaux par exemple il peut intervenir dans la synthèse des protéines (Wingate *et al.*, 1988; Baier et Dietz, 1997).

2.3.2.4 Les caroténoïdes

Comme la vitamine E, les caroténoïdes sont des molécules liposolubles produites par les organismes photoautotrophes. Ils doivent donc être acquis par l'alimentation chez les animaux (El-Agamey *et al.*, 2004). Les caroténoïdes les plus connus sont l'astaxanthine, le lycopène, le beta-carotène, la lutéine et la zéaxanthine (El-Agamey *et al.*, 2004). Ils sont capables de réagir avec les DRO de trois façons soit par le transfert d'électron, le transfert d'hydrogène ou la liaison directe avec le DRO. De plus, ils sont

capables de régénérer la vitamine E et sont eux-mêmes régénérés par la vitamine C (Hermes-Lima, 2005).

Ils sont situés dans les chloroplastes des végétaux et sont impliqués dans la photosynthèse à deux niveaux. Premièrement en tant que pigments accessoires : ils collectent l'énergie lumineuse (spectre entre le violet et le rouge) et la transfèrent aux chlorophylles. De plus, ils jouent un double rôle de photoprotection lors de l'excès de lumière : ils peuvent dissiper sous forme de chaleur une partie de l'énergie absorbée en excès, et aussi, ils s'avèrent efficaces pour éliminer l'oxygène singulet à cause de leur association aux PSII (Asada, 1994; Miller *et al.*, 1996).

2.3.2.5 Les oligoéléments

Certaines enzymes antioxydantes requièrent un oligoélément pour maintenir leur activité catalytique (Berger, 1997) comme le zinc et/ou le cuivre pour la SOD, sélénium pour la GPx. Parmi les oligoéléments on peut citer :

- i) Le sélénium (Se) se trouve en traces dans l'organisme. Il constitue le centre catalytique actif des glutathions peroxydases (séléno-protéines) qui prend en charge le peroxyde d'hydrogène (Nève, 2002).
- ii) Le zinc (Zn) est un cofacteur de nombreuses enzymes qui intervient dans plusieurs processus métaboliques et il protège les fonctions thiols des protéines contre l'oxydation. De plus, il constitue aussi le centre réactionnel de la SOD (Mandelker, 2008).
- iii) Le cuivre (Cu) est un oligo-élément cofacteurs essentiels de la SOD. Toutefois, au même titre que le fer, il peut conduire à la formation des DRO en jouant un rôle de métal de transition (comme dans la réaction de Fenton) (Crichton *et al.*, 2002; Dunford, 2002).

2.3.2.6 Les polyphénols

Une alimentation riche en produits végétaux où les polyphénols sont particulièrement abondants contribue à la défense des organismes contre le stress oxydant et les dommages des DRO. Les polyphénols sont des métabolites secondaires constituant l'un des groupes les plus abondants dans le royaume végétal avec plus de 8000 structures différentes. Ils possèdent un ou plusieurs noyaux aromatiques, auxquels sont directement liés un ou plusieurs groupements hydroxyles libres ou engagés dans une fonction ester, éther ou hétéroside (Bruneton, 1993). Les polyphénols peuvent être divisés en de nombreuses classes qui se différencient par la complexité du squelette de base, le degré de modifications de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation), ainsi que par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines).

Deux groupes importants des polyphénols sont les flavonoïdes et les acides phénoliques (dont les acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques). Les acides phénoliques sont des dérivés d'acide benzoïque (acide gallique) ou des dérivés d'acide hydroxycinnamiques (acide coumarique). Les principales classes des flavonoïdes (Figure 2.2a) sont les flavonols (comme la quercétine, le kaempférol), les flavones (comme le lutéoline), les flavanols (comme les catéchines) et les isoflavones (comme la génistéine). (Dixon et Paiva, 1995).

Les polyphénols contribuent à plusieurs fonctions physiologiques dans la plante comme la protection contre les rayons ultraviolets (UV), la défense contre les herbivores et les pathogènes, ainsi que pour certaines interactions biotiques comme la couleur des fleurs et l'attraction d'insectes et oiseaux pollinisateurs (Edreva, 2005).

De plus, il est déjà bien connu que les composés phénoliques démontrent une forte CA. Plusieurs composés phénoliques ont même une capacité antioxydante supérieure, sur une base molaire, à celle de l'acide ascorbique (Rice-Evans, 2001). Leur concentration dans les tissus végétaux augmente fortement lors de conditions de

stress environnementaux (UV, froid, métaux lourds...) (Dixon et Paiva, 1995). Ceci explique pourquoi ils sont considérés comme des composés jouant un rôle d'antioxydant *in planta*, quoique les mécanismes impliqués ne sont pas élucidés.

Il faut noter que le pouvoir antioxydant des polyphénols est attribuable à la position des doubles liaisons et de la quantité de groupements hydroxyles, ainsi que la structure catéchol de l'anneau benzoïque (B) (Yamasaki *et al.*, 1997). Les polyphénols avec un groupement diphenol en position ortho ou para comme les catéchines ont un potentiel d'oxydation plus faible, donc sont plus facilement oxydés, que ceux avec des diphenols en position méta ou des phénols seuls comme les flavones qui sont moins réactives (Kilmartin *et al.*, 2001) (Figure 2.2).

De même, les polyphénols sont des bons chélateurs de métaux à cause de leur structure chimique (un noyau catéchol est un 1,2-dihydroxybenzène avec deux OH voisins sur un cycle aromatique). Ils forment des chélates avec les ions métalliques à charge positive (comme le Fe^{3+}) en remplaçant un ou deux protons du polyphénol par l'ion métallique (Dangles, 2006).

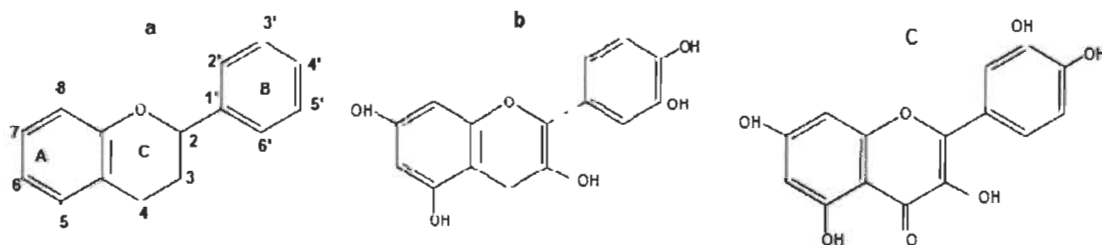


Figure 2.2 (a) Squelette typique des flavonoides, (b) catéchines (Dixon et Paiva, 1995), (c) flavones (Yamasaki *et al.*, 2007; Kilmartin et Hsu, 2003; Dixon et Paiva, 1995).

De par leurs propriétés chimiques mentionnées ci-haut ainsi que leur abondance, les polyphénols jouent un rôle majeur dans la capacité antioxydante des tissus végétaux. En effet, Cai et ses collaborateurs (2004) ont mesuré la CA par la méthode de l'ABTS de

112 espèces de plantes médicinales chinoises traditionnelles connues pour leurs vertus anticancéreuses, alors que Folin-Ciocalteu a été utilisé pour le dosage des polyphénols totaux. Les résultats ont montré l'existence d'une corrélation linéaire positive fortement significative entre l'activité antioxydante et la teneur en polyphénols totaux pour toutes les herbes médicinales testées (extractions méthanolique/aqueuse $R^2 = 0.964/0.953$) (Figure 2.3). Cependant, il faut mentionner que les valeurs de Folin-Ciocalteu estiment à la fois la CA et la concentration des polyphénols, alors que dans cette étude ces valeurs ont été considérées comme une estimation de la concentration en polyphénols, ce qui a pu entraîner de la redondance.

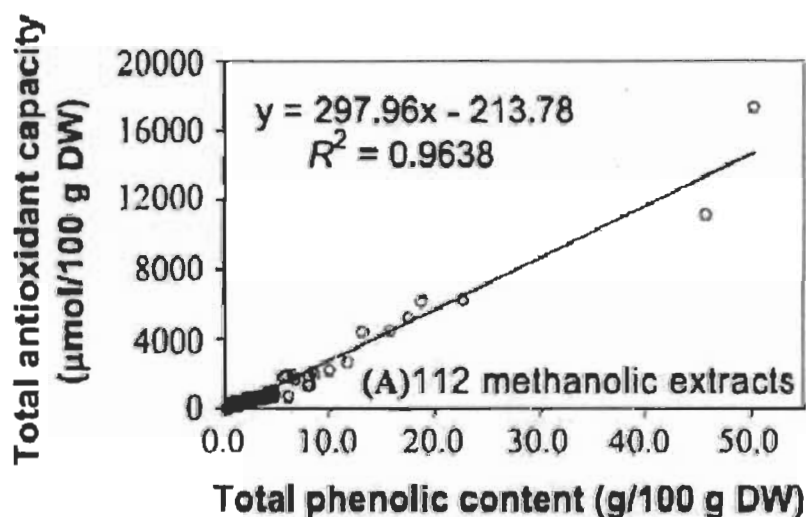


Figure 2.3 La CA de 112 plantes médicinales chinoises en fonction de leur concentration en polyphénols solubles (DW = masse sèche) (Cai *et al.*, 2004).

Enfin, il faut aussi mentionner que l'activité antioxydante des polyphénols *in vivo* chez l'humain, n'est pas encore bien établie en raison que la majorité des polyphénols sont peu biodisponibles et leur absorption digestive est faible (Sun *et al.*, 2002). En effet, après l'ingestion d'une quantité d'environ ± 1 g/jour de polyphénols (qui se trouve dans l'alimentation), la concentration plasmatique en divers sous-groupes des polyphénols ne dépasse pas 1 μ M. Cette concentration est assez faible si on la compare aux

concentrations en vitamine C (60-80 μM), en vitamine E (5 à 36 μM) et en β -carotène (1 à 3 μM) (Spencer *et al.*, 2001).

Cependant, Schalbert et Williamson (2001), suggère que les polyphénols peuvent être catabolisés en divers métabolites qui pourraient contribuer à augmenter la CA totale du plasma. Pour conclure, quelle que soit la nature de l'antioxydant, nombreux sont les paramètres qui peuvent influencer son activité *in vivo* comme : la biodisponibilité, la solubilité, la capacité de rétention dans les tissus et l'interaction avec les protéines (Dubeau *et al.*, 2010). De plus, la réponse de l'organisme peut différer d'un individu à un autre pour une même molécule. Un aspect important qui ne sera pas considéré dans ce mémoire.

2.3.2.7 Autres antioxydants

Il existe d'autres molécules que celles évoquées plus haut qui contribuent à la détoxification des DRO comme :

- i) L'urate qui est capable de détoxifier les ions superoxydes, les radicaux hydroxyles, et joue aussi le rôle d'un chélateur de métaux de transition (Chamorro *et al.*, 2004).
- ii) La bilirubine lutte contre les radicaux peroxyde et contre le peroxyde d'hydrogène (Powers et Jackson, 2008).
- iii) L'acide α -lipoïque qui piège l'oxygène singulet, le radical hydroxyle, et l'acide hypochlorite. Il chélate aussi certains métaux de transition; et il participe au recyclage d'autres antioxydants notamment la vitamine C et/ou la vitamine E (Packer *et al.*, 1995). Il pourrait également augmenter la concentration en glutathion en favorisant la régénération du GSSG (Packer *et al.*, 1995).

2.3.3 Systèmes de détoxification des DRO

En conditions de stress physiologiques/environnementaux, la formation de DRO dans la cellule augmente et peut affecter les structures cellulaires. Le maintien d'un niveau non toxique des DRO est assuré par les antioxydants. Ces derniers agissent rarement seuls pour dégrader les DRO, mais plutôt ils agissent au sein de systèmes avec des composantes enzymatiques pour la neutralisation des DRO (Droge, 2002).

La figure 2.4 représente le système de détoxification dans les mitochondries où une proportion de l'oxygène (1 à 3 % selon le taux de transport d'électrons) peut échapper à la réduction complète et subir ainsi une réduction mono-électronique (gain d'un électron) au niveau de l'ubiquinone pour produire l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ (Cadenas et Sies, 1998). Ce dernier est éliminé par les enzymes superoxydes dismutases (SOD) par dismutation pour former le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui sera décomposé à son tour par la catalase (CAT) en oxygène et en eau. L'enzyme glutathion peroxydase peut aussi prendre en charge le H_2O_2 oxydant le glutathion (GSH) pour former une molécule inerte qui est l'eau. Le glutathion utilisé sera régénéré par le NADPH en présence de l'enzyme glutathion réductase (Nordberg et Amer, 2001).

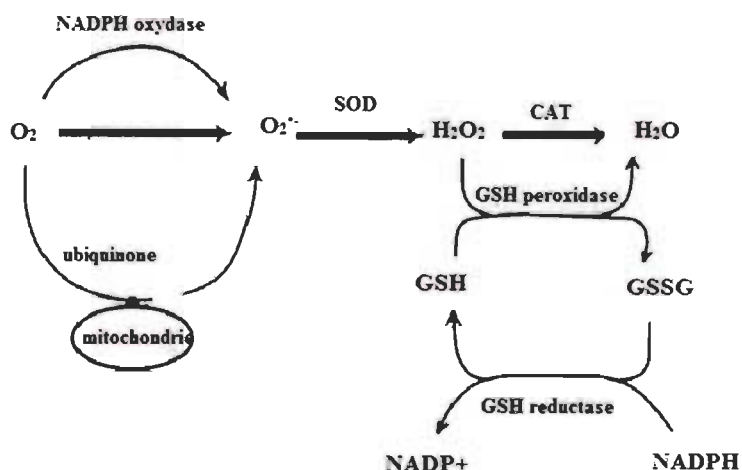


Figure 2.4 Mécanisme de détoxification des DRO au niveau des mitochondries.
http://www.sfar.org/acta/dossier/archives/ca06/html/ca06_15/ca06_15.htm

Chez les plantes, la défense contre les effets néfastes des DRO repose principalement sur le cycle Halliwell-Asada, (Badenhorst *et al.*, 1998), qui s'effectue dans les chloroplastes, directement près des sites de production des DRO. Ce cycle Halliwell-Asada représenté dans la figure 2.5, consiste en une série de réactions d'oxydoréduction où tout d'abord la SOD superoxyde dismutase transforme l'ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui sera réduit en eau et en oxygène par l'ascorbate peroxydase (AP_x) par l'oxydation de l'ascorbate. Le radical monodéhydroascorbate (MDHA) issu de cette réaction sera transformé en ascorbate et déhydroascorbate (DHA) par la monodéhydroascorbate réductase (MDHAR) en utilisant du NADPH (provenant du photosystème I). Il existe une deuxième enzyme pour la régénération de l'ascorbate, soit la déhydroascorbate réductase. Cette régénération se fait en présence de cette enzyme par oxydation de deux molécules de glutathion. La dernière réaction de ce cycle est la réduction du glutathion oxydé GSSG par la glutathion réductase en utilisant du NADPH (ce dernier produit par le PSI).

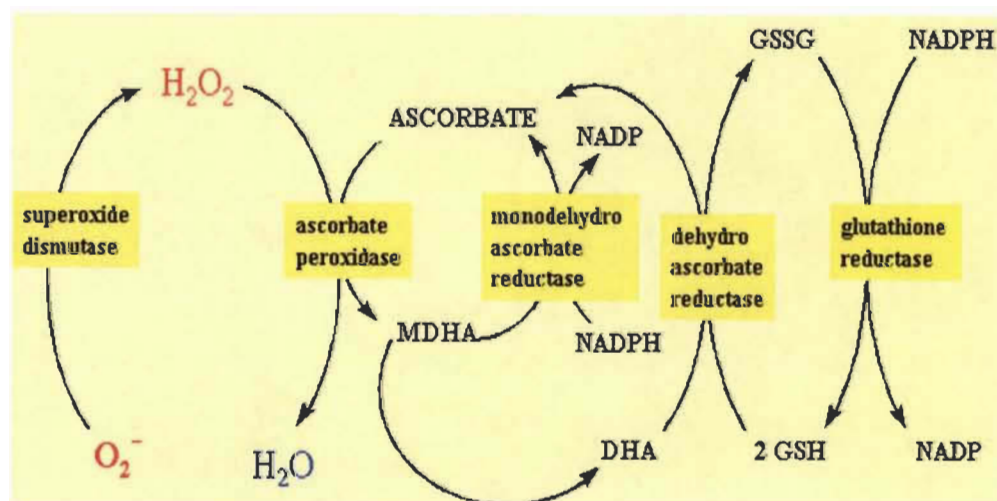


Figure 2.5 Cycle Halliwell-Asada de détoxification du superoxyde par l'ascorbate peroxydase (Davey *et al.*, 2000).

Il a été proposé que lorsque le cycle Halliwell-Asada ne suffit pas pour la détoxification des DRO, les polyphénols peuvent agir comme une seconde ligne de défense pour les neutraliser (Edreva, 2005). En effet, les flavonoïdes, une des classes des polyphénols, peuvent céder un électron pour réduire le peroxyde d'hydrogène produisant

ainsi de l'eau et de l'oxygène (Castelluccio *et al.*, 1995; Yamasaki *et al.*, 1997). Cette réaction est catalysée par les peroxydases de classe III, le plus souvent dénotée guaiacol peroxydase vPX, qui se retrouvent dans les vacuoles et l'apoplaste (Halliwell et Gutteridge, 2007; Yamasaki *et al.*, 1997). Les flavonoïdes oxydés peuvent être réduits par l'acide ascorbique qui à son tour pourra être réduit par l'enzyme déhydroascorbate réductase DHAR.

Malgré ce modèle impliquant les flavonoïdes, certains chercheurs doutent toujours du rôle des polyphénols en tant qu'antioxydant *in planta*. En effet, ceux-ci sont principalement localisés dans les vacuoles des cellules épidermiques, donc loin des principaux sites de production des DRO (chloroplastes, mitochondries). Cependant, les polyphénols peuvent éliminer ces derniers, car le H_2O_2 étant peu réactif (long temps de vie), il peut facilement diffuser sur de longues distances dans la feuille et donc rejoindre les polyphénols jusque dans l'épiderme (Iriti et Faoro, 2003; Yamasaki *et al.*, 1997).

2.4 Différentes méthodes de mesure de capacité-antioxydante

Considérant d'une part l'importance nutritionnelle des antioxydants dans la prévention de plusieurs maladies, et d'autre part, leur rôle physiologique potentiel dans la protection des plantes contre les dommages causés par les DRO lors de stress oxydant, il est nécessaire de disposer de méthodes permettant d'évaluer de la manière plus précise possible la CA globale d'un aliment ou d'une plante (de ses tissus ou organes).

Cependant, à cause de la complexité des processus d'oxydo-réduction impliqués et la nature diversifiée à la fois des DRO et des antioxydants, il n'existe aucune méthode universelle par laquelle la capacité antioxydante (CA) peut être exprimée d'une façon précise. Plusieurs méthodes ont été développées pour estimer cette capacité antioxydante (voir section 2.5). Leur principe de fonctionnement se base sur la réaction fondamentale d'oxydation-réduction impliquant soit un transfert d'électron soit un transfert d'un atome d'hydrogène (Walker, 2001).

Les antioxydants peuvent désactiver les DRO par deux réactions principales, transfert d'électron et le transfert d'hydrogène. Il faut noter, que ces deux réactions peuvent se produire en parallèle, et qu'elles sont parfois difficiles à distinguer (Prior *et al.*, 2005). Le mécanisme réactionnel dominant dans un système donné sera déterminé par deux facteurs majeurs : l'énergie de dissociation de liaison et le potentiel d'ionisation (l'énergie qu'il faut fournir à un atome ou une molécule pour arracher un électron). La structure et la solubilité des antioxydants, le coefficient de partage (constante d'équilibre de la réaction) jouent aussi un rôle essentiel dans la détermination de mécanisme dominant (Wright *et al.*, 2001).

Suivant les réactions d'oxydo-réduction impliquées, la majorité des méthodes d'évaluation de la CA peut être divisée en deux catégories (Tableau 2.1). La première catégorie est SET (Single Electron Transfer) : ces méthodes sont basées sur le transfert d'électron. Elles mesurent la capacité d'un antioxydant à transférer un électron non accompagné d'un atome d'hydrogène pour réduire les DRO. La seconde catégorie est HAT (Hydrogen atom transfer) : c'est méthodes basées sur le transfert d'un atome hydrogène. Elles mesurent donc la capacité d'un antioxydant à neutraliser les DRO par le don d'hydrogène (Huang *et al.*, 2005; Prior *et al.*, 2005). Il est intéressant de mentionner qu'un antioxydant individuel tel que décrit plus haut peut agir par différents mécanismes ou par un unique mécanisme, cela en fonction du système de réaction (Ishige *et al.*, 2001). En outre, les antioxydants peuvent répondre d'une manière différente à différentes sources de radicaux.

Les méthodes basées sur le transfert d'électron (SET) mesurent de la capacité d'un antioxydant (AH) à réduire un oxydant (Ox), qui change de couleur quand il est réduit. Toutefois, les méthodes SET sont très sensibles à l'acide ascorbique et l'acide urique, vu qu'ils cèdent généralement deux électrons (Huang *et al.*, 2005). Cependant, les oligo-éléments et les contaminants (en particulier métaux) interfèrent avec les méthodes SET et peuvent causer une haute variabilité des résultats (Prior *et al.*, 2005). La réactivité relative des SET est basée sur la déprotonation (lié à l'acidité) et le potentiel d'ionisation du groupe fonctionnel de l'antioxydant et par conséquent elles dépendent du

pH (Lemanska *et al.*, 2001). La CA mesurée par les SET est calculée à partir du pourcentage d'inhibition du radical en présence de l'antioxydant.

Les méthodes basées sur le transfert d'hydrogène (HAT) mesurent la capacité d'un antioxydant à neutraliser un radical libre par don d'un hydrogène. La réactivité relative des HAT est déterminée par l'énergie de dissociation de liaison des groupes de donneurs d'hydrogène des antioxydants. C'est pour cette raison qu'elles sont indépendantes du solvant et du pH utilisé (Wright *et al.*, 2001). La présence d'agents réducteurs telle que les métaux pourrait fausser leurs résultats (Prior *et al.*, 2005). Le calcul de la CA mesurée par les HAT est basé sur des courbes cinétiques.

Tableau 2.1

Méthodes de mesure de CA *in vitro* (Huang *et al.*, 2005)

Méthodes basées sur le transfert d'électron (SET)	TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity)
	DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
	FRAP (Ferric reducing antioxidant power)
	Copper (II) reduction capacity
	Réactif Folin-Ciocalteu
Méthodes basées sur le transfert d'hydrogène (HAT)	ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)
	TRAP (Total radical-trapping antioxidant parameter)
	Crocin bleaching assay
	IOU (Inhibited oxygen uptake)
	Inhibition of LDL oxidation

2.4.1 Méthodes utilisant les mécanismes de transfert d'électron (SET)

2.4.1.1 TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) avec ABTS

Cette méthode introduite par Miller et Rice-Evans (1993) est basée sur la capacité des antioxydants à neutraliser le radical ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique). La solution ABTS est obtenue en mélangeant l'ABTS avec un oxydant (généralement le persulfate de

potassium) qui donne une solution d'une couleur bleu intense. La CA est mesurée comme la capacité des composés tests à diminuer l'intensité de la coloration obtenue à partir de l'ABTS en la comparant avec un antioxydant de référence, le Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique) dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E sans la chaîne aliphatique. La réduction de l'ABTS (Figure 2.6) conduit à une décoloration du bleu de la solution ABTS mesurée à 645 - 734 nm de la solution (Re *et al.*, 1999). Plus l'absorbance finale est faible, plus la valeur TEAC est élevée, c.-à-d. plus l'antioxydant est efficace (Schlesier *et al.*, 2002).

Cette méthode a pour avantages sa simplicité à mettre en œuvre et sa rapidité. De plus, la solution d'ABTS est soluble dans l'eau et dans les solvants organiques et n'est pas affectée par la force ionique, elle peut donc déterminer la CA lipophile et hydrophile (Awika *et al.*, 2003).

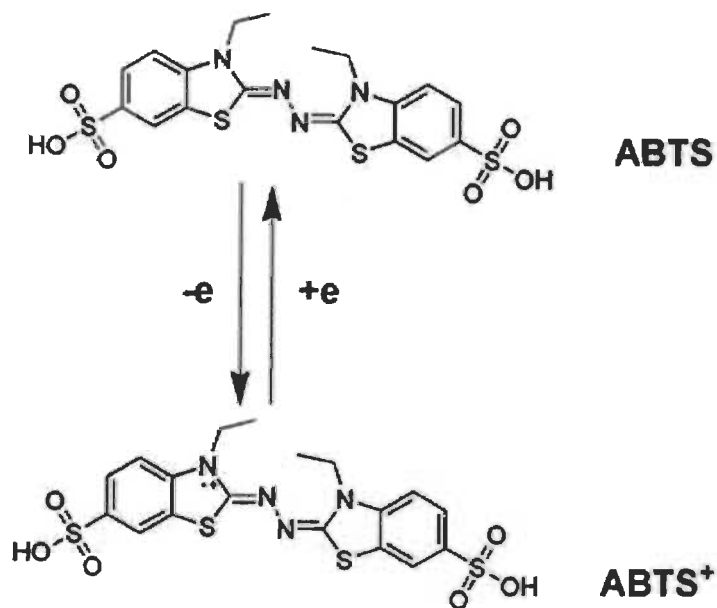


Figure 2.6 Oxydo-réduction de l'ABTS en ABTS^{•+} (Christopher *et al.*, 2014).

Cependant, le principal inconvénient de la méthode TEAC avec l'ABTS est que la méthode est basée sur l'hypothèse que les réactions d'oxydo-réductions se déroulent

rapidement, de sorte que toutes les réactions soient terminées entre 4 et 6 minutes. Toutefois, il existe des réactions d'oxydo-réductions plus lentes. Donc la méthode n'est pas adéquate pour toutes les réactions, ce qui peut donner des valeurs de CA erronées si on lit avant la fin de la réaction (Prior *et al.*, 2005).

Van den Berget et ses collaborateurs (1999) ont conclu que « l'évaluation quantitative de la CA en utilisant la méthode TEAC peut être difficile, voire impossible, mais elle peut être utilisée pour fournir un ordre de classement des antioxydants ».

2.4.1.2 TEAC avec DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Le radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) est un des radicaux azotés organiques les plus stables, qui porte une couleur pourpre. Tout comme le TEAC utilisant l'ABTS c'est une méthode colorimétrique basée sur la perte de couleur à 515 nm due à la réduction du DPPH (Figure 2.7). La concentration en antioxydants est proportionnelle à la baisse de l'absorbance due à la diminution de l'intensité de la coloration de la solution DPPH. Cette concentration sera donc calculée en pourcentage :

$$AA\% = 100 - ((Abs_{\text{échantillon}} - Abs_{\text{blanc}}) \times 100) / (Abs_{\text{contrôle}}) \text{ (Mensor } et al., 2001).$$

La méthode a pour avantages d'être relativement simple et peu coûteuse (Prior *et al.*, 2005). Cependant, elle a pour inconvénients que des antioxydants peuvent rester inertes face au DPPH relativement stable (Huang *et al.*, 2005). De plus, certaines réactions avec le DPPH sont réversibles et peuvent mener à une sous-estimation du potentiel des produits testés, et beaucoup d'antioxydants peuvent réagir plus lentement avec le DPPH (Huang *et al.*, 2005). De même, l'interprétation est compliquée quand d'autres composés ont des absorbances qui se chevauchent avec celles de DPPH à 515 nm, comme les caroténoïdes.

En outre, le DPPH n'est soluble que dans des solvants organiques (éthanol, méthanol), ce qui rend la mesure de la CA d'antioxydants hydrophiles difficiles (Arnao,

2000). Le dernier inconvénient que pose ce radical est son instabilité à la lumière, c'est pourquoi les tests réalisés avec le DPPH doivent impérativement se faire dans l'obscurité (Ozcelik *et al.*, 2003).

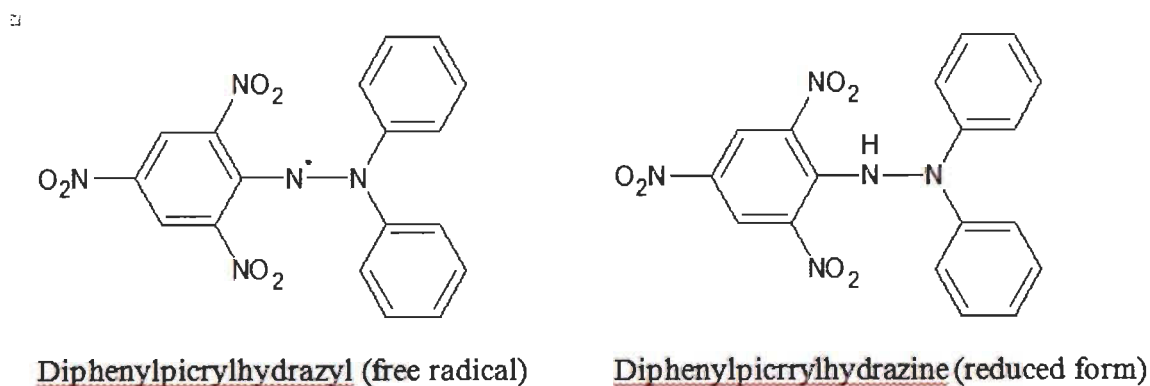


Figure 2.7 Le radical DPPH et sa forme réduite (Agatonovic-Kustrin *et al.*, 2014).

Bien que les méthodes ABTS et DPPH soient généralement classées en SET, ces deux radicaux peuvent en fait être neutralisés soit par réduction directe via des transferts d'électrons ou par des transferts d'atome d'hydrogène (Prior *et al.*, 2005).

2.4.1.3 FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*)

La méthode FRAP est un dosage colorimétrique du transfert d'électrons, basée sur la capacité des produits testés à réduire le fer (le passage de la forme ferrique à ferreux) (Pellegrini *et al.*, 2003). Elle consiste à observer après quatre minutes le changement d'absorbance à 593 nm dû à la réduction du complexe Fe^{3+} -TPTZ (fer 2, 4,6-tripyridyl-s-triazine) et l'apparition d'une couleur bleue (Benzie et Strain, 1996; Roginsky et Lissi, 2005) (Figure 2.8).

Originellement conçue pour mesurer le potentiel antioxydant du plasma sanguin, la méthode FRAP a pour avantage d'être aussi adéquate pour mesurer le potentiel de composés purs (Prior *et al.*, 2005). De plus, elle est simple, rapide et peu coûteuse.

Toutefois, la principale limite de cette méthode réside dans le temps de réaction. En effet, le potentiel de plusieurs molécules ne peut être mesuré par FRAP, comme certains phénols qui réagissent plus lentement et demandent un temps de réaction plus long pour leur détection (30 minutes) (le même inconvénient que pour la méthode ABTS) (Huang *et al.*, 2005). De plus, elle n'est pas capable de détecter les protéines ou les composés contenant le groupe sulfhydryle SH, incluant les thiols, qui peuvent transférer l'hydrogène (Prior *et al.*, 2005).

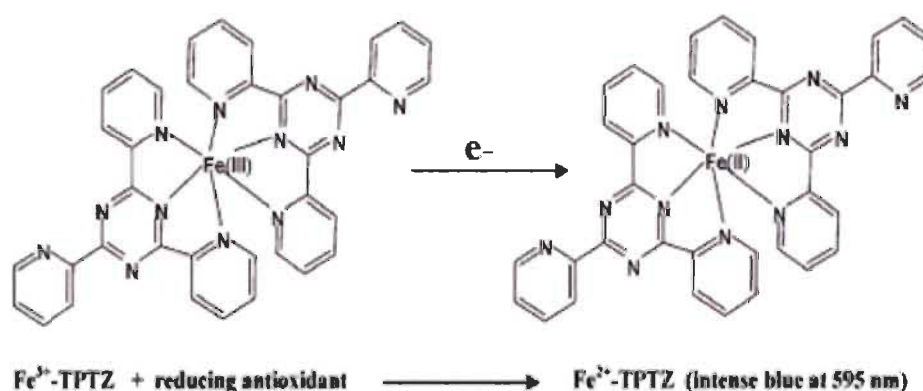


Figure 2.8 Réaction de la méthode FRAP (Prior *et al.*, 2005).

2.4.1.4 Folin-Ciocalteu

La méthode de Folin-Ciocalteu a été mise au point en 1927 (Folin et Ciocalteu, 1927) et ensuite revue et améliorée par Singleton et Rossi (1965). Elle est généralement utilisée pour le dosage des polyphénols, mais elle peut être utilisée aussi pour la mesure de CA puisque son mécanisme de base est une réaction d'oxydoréduction (Prior *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005).

Son principe est simple, lors de l'oxydation des phénols, le réactif Folin (constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) est réduit en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène

(Ribéreau-Gayon, 1968). La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon.

L'avantage de cette méthode est qu'elle est simple et peu coûteuse. Cependant, son inconvénient c'est que le réactif Folin n'est pas spécifique aux polyphénols, et peut réagir avec d'autres composants non-phénoliques notamment les sucres réducteurs comme le glucose et le fructose, l'ascorbate, l'acide tartrique et les sulfites (Prior *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005) en plus de certaines substances inorganiques qui peuvent également réagir avec le réactif de Folin pour donner des concentrations élevées ce qui faussent les résultats (Prior *et al.*, 2005).

2.4.2 Méthodes utilisant les mécanismes de transfert d'hydrogène (HAT)

2.4.2.1 Les méthodes ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)

Ces méthodes sont basées sur le travail de Ghiselli (1995) et développées par Cao (1998). Elles mesurent la capacité d'un antioxydant à prévenir les dommages oxydant d'une molécule cible par des radicaux peroxydes générés par l'AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride) (Crichton *et al.*, 2002) (Figure 2.9).

Originellement conçues avec la β -phycoerythrin (B-PE) comme fluorochrome, elles furent par la suite améliorées en remplaçant la B-PE par de la fluorescéine, le rouge pyrogallol (RP), ou encore l'acide linoléique. L'utilisation de ce dernier peut nous donner une idée plus proche des réactions *in vivo* puisque c'est un acide gras très abondant dans les graisses végétales et animales.

Ces méthodes consistent à suivre la dégradation de la molécule cible lorsqu'elle est oxydée par les radicaux peroxydes générés à partir du AAPH à 37 °C (Ou *et al.*, 2001). La présence d'antioxydants qui vont transférer leur hydrogène aux radicaux peroxydes dans l'échantillon va retarder la dégradation la molécule cible. Donc la CA est déterminée par la diminution de l'intensité de fluorescence ou la baisse d'absorbance du

rouge pyrogallol ou encore une hausse d'absorbance due à l'accumulation de produits de la peroxydation de l'acide linoléique en fonction du temps.

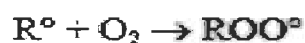
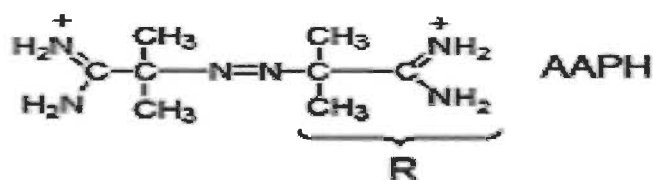


Figure 2.9 Génération de radicaux peroxydes à partir de l'AAPH.

178.32.157.81/hedhili/potentiel_antioxydant.html

Les méthodes ORAC font intervenir une mesure cinétique afin de déterminer la CA. Des courbes de la dégradation de la molécule cible en présence ou non d'un antioxydant sont tracées en fonction du temps, et l'aire située entre les deux courbes de décroissance est calculée (Cao, 1998; Cao et Prior, 1999) (Figure 2.10).

Les méthodes ORAC ont pour avantage d'être sensibles, standardisées et adaptées aux antioxydants hydrophiles et lipophiles (Prior *et al.*, 2005). Elles peuvent aussi être applicables pour évaluer la CA des aliments (Cao *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996) y compris les extraits de fruits, légumes et les thés (Prior *et al.*, 2003) aussi que les solutions biologiques comme le plasma sanguin (Prior *et al.*, 2003).

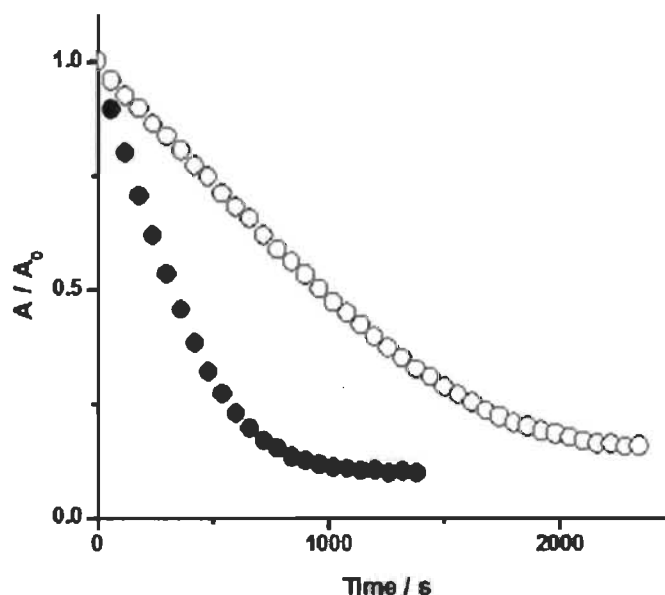


Figure 2.10 Exemple de courbes cinétiques de dégradation de RP en présence (o) et en absence (●) du vin rouge (A/A_0 : absorbance dans le temps/temps 0) (Alarcon -Lopez *et al.*, 2011).

Cependant, les principaux inconvénients de l'utilisation de l'ORAC sont que ces réactions sont sensibles à la température, juste une faible différence de température peut diminuer la reproductibilité de la méthode (Phipps *et al.*, 2007). Notons aussi que le temps d'analyse est assez important (Prior *et al.*, 2005).

Malgré ces inconvénients, selon Huang et ses collaborateurs (2005) et United States Département of Agriculture USDA (2007), les méthodes ORAC sont les meilleures pour la mesure de CA, en raison de sa pertinence biologique aux antioxydants *in vivo*.

Il existe d'autres méthodes utilisant les mécanismes de transfert d'hydrogène (HAT) comme TRAP (Total radical-trapping antioxidant parameter), HORAC (Assay Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity), Chemiluminescence (CL) qui ne seront pas abordées dans cette maîtrise vue que leur réaction de base est similaire à celle d'ORAC. De plus, le temps d'analyse est beaucoup plus important que celui d'ORAC, c.-à-d. la réaction de TRAP est de 300 min (Prior *et al.*, 2005).

2.5 Pourquoi a-t-on besoin de posséder un outil clair pour l'estimation de la CA globale?

Comme on vient de le voir, il existe plusieurs méthodes permettant de mesurer la CA, mais aucune de ces méthodes à elle seule n'est suffisante pour exprimer la CA globale des produits à analyser. En effet, une seule méthode ne peut tenir compte de la diversité de la nature des antioxydants (hydrophile, hydrophobe) ainsi que la complexité des processus d'oxydo-réduction impliqués dans les réactions des méthodes (SET, HAT). Bien que de fortes corrélations entre plusieurs méthodes aient été établies, plusieurs chercheurs insistent sur l'importance de caractériser la CA d'un aliment ou d'un produit par l'utilisation de plusieurs méthodes (Pellegrini *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005; Stratil *et al.*, 2006).

Par conséquent, en raison de l'absence d'un test standard à l'heure actuelle, il est difficile de comparer les résultats rapportés de différentes recherches. La CA d'une variété d'aliments est généralement mesurée par plusieurs méthodes, et les comparaisons sont essentiellement faites à partir des classements (ou rang) des échantillons entre eux (Prior *et al.*, 2005).

Mais sur quelles bases doit-on choisir les méthodes? Comment fait-on pour dire et démontrer celles qui sont complémentaires ou redondantes? Que fait-on avec les valeurs de CA provenant des différentes méthodes? Autrement dit, comment combiner ces valeurs quantitativement?

Par exemple, Pellegrini et ses collaborateurs (2003) ont mesuré la CA de 34 légumes, 30 fruits, 34 breuvages et 6 huiles végétales par trois différentes méthodes, ABTS, TRAP (Total radical-trapping antioxidant parameter) et FRAP. Les valeurs de CA de boissons alcoolisées, thés et cafés obtenues par différents dosages étaient bien corrélées (TRAP vs FRAP : $R^2 = 0.993$; ABTS vs FRAP : $R^2 = 0.997$, TEAC vs TRAP : $R^2 = 0.993$). Dans cette étude, les différents groupes d'échantillons ont été classés selon chaque méthode à part, sans pouvoir donner un classement combiné.

De même, dans l'étude de Ciz et ses collaborateurs (2010), où la CA d'une variété de légumes a été mesurée par Folin- Ciocalteu, TRAP, ORAC-fluorescéine (ORAC-FL) et HORAC (Assay Hydroxyl radical antioxidant capacity). Leurs résultats démontrent une corrélation significative entre toutes les méthodes où les coefficients de corrélation varient de 0.94 à 0.97. Tout comme l'étude de Pellegrini et ses collaborateurs, ils ont classé également la CA des légumes selon chaque méthode.

L'étude de Seeram et ses collaborateurs (2008) semblent être la plus rationnelle puisqu'ils ont proposé un indice $CA = (\text{mesure obtenue}/\text{meilleur rang}) \times 100$ pour chaque méthode. Ensuite, la moyenne de l'ensemble des indices dénoté « antioxidant potency composite index » correspond à un indice global de CA pour chaque boisson. Pour ce faire, les CA d'une variété de 34 breuvages commercialisés réputés pour avoir une forte CA ont été mesurées par 4 méthodes, soit DPPH, ABTS, FRAP et ORAC-FL. La méthode Folin-Ciocalteu était utilisée pour estimer la teneur en polyphénols non pour la mesure de la CA. Pour chacune des méthodes, les valeurs de chaque échantillon ont été normalisées par rapport à la valeur la plus élevée de cette méthode, et finalement la moyenne des valeurs normalisées des quatre méthodes a été calculée pour chaque échantillon. Les résultats démontrent que l'ordre de classement de CA calculée selon l'indice est le même que la teneur totale en phénolique dans les breuvages. Ceci suggère que la CA est fortement liée à la teneur en polyphénols. Toutefois, l'obstacle de leur indice réside dans le fait qu'il dépend des résultats des autres échantillons. De plus, les méthodes utilisées peuvent être redondantes et fournissent ainsi des valeurs exagérées pour le même échantillon.

Pour estimer la redondance (et inversement, la complémentarité) entre les méthodes de dosage de la CA, il est utile de comparer les corrélations établies entre les valeurs de CA estimées par différentes méthodes dans les études rapportées dans la littérature. Le tableau 2.2 résume l'information trouvée dans sept études utilisant différents produits. En général, les coefficients de corrélation R sont plutôt élevés (supérieurs à 0,9), quoique certaines études rapportent de faibles corrélations entre les méthodes c.-à-d. : Folin-Ciocalteu vs ABTS $R = 0,42$ (Scalzo *et al.*, 2005). Une telle

variation pourrait s'expliquer par différents degrés de complémentarité entre les méthodes, ainsi que par la diversité des échantillons utilisés (tisanes et thés, fruits, bières).

Tableau 2.2
Quelques études de mesure de CA d'une variété d'échantillons

Étude	Nombre d'échantillons	Méthodes utilisées	Corrélation	Méthodes utilisées dans ce mémoire
Cai <i>et al.</i> , 2004	Plantes médicinales chinoises n = 112	ABTS Folin-Ciocalteu	Extractions méthanolique/aqueuse $R^2 = 0.964/0.953$	
Atoui <i>et al.</i> , 2005	Variétés de thés, tisanes n = 9	Luminol chimiluminescence (Cl) DPPH Folin-Ciocalteu	Cl vs DPPH $R^2 = 0.97$ Folin-Ciocalteu vs DPPH $R^2 = 0.58$ Folin-Ciocalteu vs Cl $R^2 = 0.53$	
Scalzo <i>et al.</i> , 2005	Fraises, pêches et abricots n = 6	ABTS Folin-Ciocalteu	Folin-Ciocalteu vs ABTS R = -0.56 pour les fraises R = 0.42 pour les pêches R = 0.09 pour les abricots	ABTS DPPH
Katalinic <i>et al.</i> , 2006	Plantes médicinales n = 70	FRAP Folin-Ciocalteu	FRAP vs Folin-Ciocalteu R = 0.980	Folin-Ciocalteu FRAP ORAC-RP ORAC-LP
Alarcon <i>et al.</i> , 2008	Thé noir, vert, blanc et tisanes n = 11	ORAC-FL ORAC-RP Folin-Ciocalteu	Folin-Ciocalteu vs ORAC-FL R = 0.935 pour les tisanes R = 0.999 pour les thés Folin-Ciocalteu vs ORAC-RP R = 0.95 pour les tisanes ORAC-FL vs ORAC-RG R = 0.943	
Mitic <i>et al.</i> , 2014	Bières n=24	ABTS DPPH FRAP	ABTS vs DPPH R = 0.83 FRAP vs ABTS R = 0.62 FRAP vs DPPH R = 0.53	

Les exemples présentés dans le tableau 2.2 indiquent donc différents degrés de corrélations entre les valeurs de CA estimées par différentes méthodes. Ces différences sont intéressantes, car elles peuvent guider le choix des méthodes à utiliser pour estimer les différents aspects de la CA, c.-à-d. utiliser les méthodes complémentaires et éviter celles qui sont redondantes. Cependant, l'examen des coefficients de corrélation ne suffit

pas pour déterminer le nombre nécessaire de méthodes à utiliser. Et surtout, ces coefficients de corrélation ne suggèrent aucunement comment combiner les valeurs de CA obtenues par les différentes méthodes pour calculer un indice global de CA. C'est pourquoi il est important à ce stade-ci d'examiner une méthode statistique plus performante, soit l'analyse en composantes principales.

2.6 Analyses statistiques : analyse en composantes principales

Les mesures de CA d'un grand nombre d'échantillons par différentes méthodes produisent une large matrice de données dont il devient difficile d'en extraire toute l'information. À cette fin, l'utilisation d'une méthode d'analyse multivariée soit celle de l'analyse en composantes principales (ACP) devient nécessaire pour : 1) mieux identifier parmi les méthodes utilisées celles étant complémentaires et celles redondantes et 2) faciliter l'interprétation des facteurs fondamentaux contribuant le plus à expliquer la variation des valeurs de CA selon les échantillons et les méthodes utilisées.

L'analyse en composantes principales (ACP) est une méthode factorielle de réduction de dimension de données quantitatives complexes. Elle permet de résumer de vastes populations décrites par plusieurs variables quantitatives, et de mettre en évidence les tendances entre les données, les regroupements d'individus ainsi que la force de liens entre eux. Il s'agit donc d'obtenir le résumé le plus pertinent possible des variables. Son but est de regrouper les échantillons (variables quantitatives) dans un nouvel espace de variables formé à partir des combinaisons linéaires des variables initiales. Ces combinaisons sont appelées composantes principales, et sont représentées comme de nouveaux axes. Ces composantes principales contiennent la majeure partie de l'information et sont orthogonales entre elles (non-corrélées) ce qui permettra d'étudier spécifiquement la complémentarité ou la non-redondance entre les méthodes.

La nouvelle distribution de variables dans une ACP est sous forme de nuage de points (ou diagramme de dispersion). Elle permet de différencier les groupes dans l'ensemble des variables en regardant celles qui se ressemblent et celles qui se

distinguent des autres. Chaque variable porte en elle une partie de l'information originale (part d'inertie) et une partie d'information redondante qui vient de la corrélation entre les variables. Lorsque deux variables sont proches les unes par rapport aux autres, elles sont alors positivement corrélées. Si elles sont orthogonales les unes par rapport aux autres, alors elles sont non-corrélées. Si elles sont symétriquement opposées par rapport au centre, elles sont alors négativement corrélées (Smith, 2002; Benzécri, 1977).

Dans l'ACP, il y a un changement de repère des données de façon à maximiser la variance définie par de nouveaux axes. Chaque composante principale est une combinaison linéaire des variables initiales. Ces composantes principales ont la particularité de ne pas être corrélées entre elles. La première composante (ou premier axe) concentre le maximum d'information, c'est l'axe de la plus grande dimension du nuage de point. Cependant, il reste des résidus de l'information expliquée par un deuxième axe orthogonal au premier qui concentre le maximum de l'information restante (Lebart *et al.*, 1984).

L'ACP est donc fort utile pour mieux comprendre les facteurs fondamentaux qui expliquent la variation des données. Dans le contexte de la CA estimée par différentes méthodes, l'ACP pourrait ainsi aider aux choix des méthodes à utiliser. Elle ne permet pas cependant de résumer quantitativement en une sorte de méta-paramètre les valeurs obtenues avec les méthodes retenues.

Pour calculer une valeur globale à partir des valeurs de CA estimées par les méthodes retenues, la régression linéaire multiple (pas à pas) semble tout indiquée. Cette méthode statistique permet d'estimer la contribution des variables et choisir parmi elles le plus petit nombre qui explique au mieux la variabilité à expliquer. Elle consiste à intégrer les variables l'une après l'autre dans un modèle mathématique et ensuite les retirer progressivement en fonction de celles qui contribuent le moins au modèle, c'est-à-dire que la variable qui n'est pas significative serait rejetée, ne gardant ainsi que les variables significatives (Blanchet *et al.*, 2008).

2.7 Description des échantillons

Pour atteindre nos objectifs (voir section 2.8), nous avons choisi nos échantillons ($n = 52$) parmi différents types de thés (blancs, verts, noirs...), tisanes et jus. Ce choix s'explique par leur importance dans notre alimentation, leur richesse présumée en antioxydants (principalement les polyphénols) et leur facilité d'extraction (infusion dans l'eau chaude pour les thés et tisanes).

Le thé représente la boisson la plus consommée dans le monde après l'eau (Cabrera *et al.*, 2003). En 2005, chaque Canadien a consommé en moyenne 280 tasses de thé, une hausse de 46 % par rapport à 1996. Qu'il soit blanc, vert ou noir, le thé provient des feuilles du même arbuste, le *Camellia sinensis*. C'est son processus de fermentation (oxydation) qui influence sa couleur. Cela est en raison de ses composés chimiques qui contiennent principalement des polyphénols, des polysaccharides, des acides aminés et des vitamines (Kuo *et al.*, 2005).

Les polyphénols du thé, principalement les flavonoïdes, sont responsables de la plupart des effets positifs sur la santé humaine (Shankar *et al.*, 2007; Friedmann, 2007; Stangl *et al.*, 2007). Il a été rapporté que la consommation des thés joue un rôle dans la prévention du risque du diabète, les maladies cardiovasculaires et le cancer (Zhou *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2012).

Camellia sinensis est le seul et unique arbre à l'origine des différentes variétés de thé. Il est particulièrement riche en polyphénols. En effet, ceux-ci représentent le tiers de la matière sèche de la feuille de thé (Millin *et al.*, 1969). En fonction des procédés de transformation, le thé vert, le noir, le blanc, le Pu-erh et l'Oolong se distinguent par l'importance de leur oxydation (fermentation) produite par des enzymes endogènes, principalement la polyphénol oxydase (Karori *et al.*, 2007).

Il faut noter que le rendement de *Camellia sinensis* peut être affecté négativement par nombreux stress environnementaux comme les stress biotiques qui diminuent

généralement le rendement des cultures moins de 10 %. Cependant, les stress abiotiques sont responsables d'une réduction qui peut aller à 65 % du rendement (Waheed *et al.*, 2012).

Pour la fabrication du thé vert (dit thé non fermenté), la fermentation est minimisée par un traitement thermique des feuilles par un chauffage de l'ordre de 100 °C pendant une durée variant de 30 secondes à 5 minutes à la vapeur. Les feuilles deviennent alors souples et facilement pliables pour l'étape suivante de roulage. Enfin, elles subissent une dessiccation jusqu'à ce que les feuilles ne contiennent plus que 5 à 6 % d'eau (Wilson et Clifford, 1992).

Le thé blanc est un autre thé peu fermenté, où seuls les bourgeons ou les premières feuilles sont recueillis et ne subissent que deux opérations. La première est un séchage naturel à l'air libre, la seconde est une dessiccation d'une durée de 52 à 60 heures (Karori *et al.*, 2007).

Les feuilles de thé vert et blanc ne sont quasiment pas fermentées, ceci explique pourquoi elles contiennent généralement le plus haut niveau de catéchines. Ces derniers sont des polyphénols qui font partie de la classe des flavonoïdes. Les catéchines, notamment l'épigallocatechine gallate (EGCG) et glycosides de flavonol sont les principaux responsables des propriétés antioxydantes des thés vert et blanc (Horner *et al.*, 2003; Almajano *et al.*, 2008).

Dans une analyse menée par Yumen Hilal (2010) sur 64 différents types de thés (30 thés blancs et 34 thés verts) provenant de Chine, du Japon, et d'Inde, il a été démontré que les concentrations en polyphénols sont à peu près égales dans les deux thés (le thé blanc contient 23 % de masse sèche et le thé vert avec 19 %).

Le thé vert se distingue du thé blanc non seulement par le mode de fabrication, mais aussi par leur apparence. Le thé blanc tire son nom de la couleur blanc argenté de ses feuilles et de la présence sur celles-ci de duvet blanc alors que le thé vert est de

couleur verte. De plus, le thé blanc contient moins de théine que le thé vert. Il s'agit exactement de la même substance que la caféine, un alcaloïde naturel qui agit comme psychotrope et comme léger diurétique. Dans le thé, la théine est associée aux tanins du thé, qui retardent son assimilation dans l'organisme, par rapport à la théine présente dans le café qui est biodisponible, donc elle passe directement au sang (Scharbert *et al.*, 2004).

Quant à la production des thés noirs et Oolong, d'abord il y a la phase de flétrissage (18 à 32 heures) où les feuilles sont étendues au soleil en couches minces sur des lits en toile afin de rendre la feuille plus souple, pour pouvoir la rouler et lui donner la forme souhaitée. Ensuite, il y a la phase de roulage, au cours de laquelle les cellules des feuilles se brisent et libèrent l'enzyme polyphénol oxydase qui déclenche la fermentation. La production de thé Oolong s'arrête à ce stade d'oxydation, par dessiccation à une température de 90-100 °C. C'est pour cette raison qu'on dit que c'est un thé semi-fermenté.

Cependant, pour le thé noir, le flétrissage et le roulage sont des étapes préparatoires pour la fermentation qui dure d'une à trois heures. Les réactions d'oxydation (fermentation) conduisent à la polymérisation des catéchines et forment ainsi de nouvelles substances notamment les théaflavines et les théarubigines (Haslam 2003; Gong *et al.*, 2012). Ces dernières sont responsables de la couleur rouge-brun du thé noir et son goût unique (Robert et Smith, 1961).

Tout comme le thé noir, le thé Pu-erh est également un thé fermenté, toutefois il se démarque des autres thés fermentés parce que lors de sa fermentation il subit un stockage prolongé ou un vieillissement (Duh *et al.*, 2004). Il est souvent dit thé sombre ou thé noir-noir, c'est pour cette raison qu'il est parfois confondu avec le thé noir. Traditionnellement il est fabriqué avec des feuilles de vieux théiers sauvages de *Camellia sinensis* var. *assamica*. Après la cueillette, les feuilles sont fermentées artificiellement pour six mois à un an avec des microorganismes. Ce processus de

fermentation entraîne des concentrations plus faibles en polyphénols (Zhang *et al.*, 2011).

Sur le marché actuel, on trouve également une grande variété de thés aromatisés et parfumés. Autrefois déjà, les Chinois et les Japonais aromatisaient leurs thés de fleurs ou d'épices. Par exemple, le thé au jasmin (le plus ancien des thés aromatisés) était préparé par roulage des feuilles de thé dans des fleurs de jasmin, les fleurs s'ouvrant et parfument le thé pendant la nuit. Aujourd'hui les procédés d'aromatisation sont plus modernes : les feuilles de thé, une fois séchées, sont pulvérisées d'huiles naturelles de fleurs, de fruits ou encore des mélanges de morceaux secs de fruits, de pétales et différents ingrédients par exemple de graines de riz et d'épices. Les aromatisations sont possibles sur tous les types de thés.

Contrairement aux thés, les tisanes sont dépourvues de la caféine (théine). Ce sont des infusions de feuilles, de racines, d'écorce, de graines ou de fleurs de différentes plantes possédant généralement des vertus médicinales. Selon la plante choisie, la tisane peut être calmante, digestive ou encore anti-nauséuse. Autre différence entre les thés et les tisanes, c'est la façon de préparation : la majorité des thés sont infusés dans une eau chaude à 95°-100 °C. La tisane quant à elle peut être infusée ou encore préparée en décoction c'est-à-dire que la tisane (feuilles, de racines, d'écorce, de graines ou de fleurs) est jetée dans l'eau bouillante et mise à infuser une quinzaine de minutes.

Le Rooibos est une tisane confondue le plus souvent avec les thés. Rooibos signifie en Afrikaans (langue néerlandaise parlée en Afrique du Sud) « buisson rougeâtre ». Cette tisane d'ailleurs est connue sous le nom de thé rouge. Son nom scientifique est *Aspalathus linearis*. Il ne pousse que dans les montagnes d'Afrique du Sud. Toutes les initiatives de le faire pousser ailleurs ont échoué (Joubert, 1997). Pour sa fabrication, les rameaux et les feuilles sont récoltés et passés dans des rouleuses pour casser les fibres. Ensuite, la fermentation débute et peut durer quelques heures, généralement en plein air pour être ensuite laissée sécher au soleil (Nakano *et al.*, 1997). Durant la fermentation, les polyphénols sont oxydés ce qui donne une couleur rouge à la

feuille de couleur verte à l'origine (Joubert, 1997). Il existe aussi une forme non fermentée appelée rooibos vert. Il est plus riche en antioxydant puisqu'il a conservé la majorité de ses polyphénols (Hong *et al.*, 2014).

Comme toutes les tisanes, le Rooibos ne contient pas de caféine. Il contient cependant, comme les thés une quantité de tanins (Nakano *et al.*, 1997). Ces derniers représentent une classe de polyphénols localisés dans les vacuoles des plantes. De plus, le rooibos est riche en polyphénols, en particulier en flavonoïdes dont l'aspalathine (rooibos est la seule source naturelle connue). Cette dernière est réputée pour ses propriétés antioxydantes présentes en forte quantité dans le rooibos vert (non fermenté). Toutefois, la présence d'ascorbate dans le rooibos indiqué par certains articles n'a pas été confirmée (Joubert, 2008).

Outre l'arôme et le goût attractif des différents types de tisanes, il est connu qu'ils représentent une source majeure de polyphénols dans notre alimentation (Shahidi, 2000). Effectivement, maintes études ont confirmé le pouvoir antioxydant de plus de 400 plantes médicinales (Toda *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2000; Namba *et al.*, 1986), pouvoir principalement attribué à leurs concentrations élevées en polyphénols (par exemple les flavonoïdes, acides phénoliques, tanins) (Rice-Evans *et al.*, 1996). Les polyphénols peuvent jouer un rôle majeur dans la prévention contre plusieurs maladies notamment le cancer (Cai *et al.*, 2004).

Les jus sont une autre source non négligeable d'antioxydants (oligoéléments, vitamines, haute teneur en polyphénols) dans notre alimentation (Fernandez de Simon *et al.*, 1992; Block et Langseth, 1994; Mayer *et al.*, 1997; Anese *et al.*, 1999). Tous ces éléments sont liés à la protection contre les DRO et les maladies issues du stress oxydant (Heber, 2004). En effet, par exemple la consommation de jus de grenade ainsi que de jus de canneberge peut prévenir les maladies cardiovasculaires, les troubles neurologiques et le cancer (Loren *et al.*, 2005; Ruel *et al.*, 2008). De même, une étude clinique de Li et ses collaborateurs (2004) suggèrent que la consommation quotidienne de jus d'agrumes

accompagnée d'une tasse et plus par jour de thé vert serait la cause d'une forte diminution de l'incidence des cancers.

2.8 Objectifs

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydo-réduction et la nature diversifiée des antioxydants (hydrophiles et hydrophobes), il n'existe pas à ce jour une méthode universelle pour la mesure de la CA. La plupart des auteurs reconnaissent que la CA est complexe et ne peut être estimée que par une seule méthode, mais sans aucune indication pour savoir comment choisir entre les méthodes ou comment combiner les valeurs quantitativement. Par conséquent, ce projet s'est donc fixé pour objectifs :

- i) Estimer et comparer la CA de divers 52 divers produits végétaux (thés, tisanes et jus) par 6 méthodes les plus usitées et potentiellement complémentaires soient ABTS, Folin-Ciocalteu, FRAP, DPPH, et ORAC-RP, ORAC-LP.
- ii) Comparer les corrélations entre les méthodes utilisées afin d'identifier parmi elles, celles qui sont complémentaires et éviter les méthodes fournissant la même information (redondantes).
- iii) Identifier les facteurs qui déterminent et expliquent le mieux les différents aspects de la CA de nos breuvages (thés, tisanes et jus) par l'analyse en composante principale (ACP) qui donne une meilleure orientation sur les méthodes qu'on doit utiliser.
- iv) Calculer un méta-paramètre pour la mesure de la CA globale basé sur les résultats de l'ACP spécifique à nos breuvages (thés, tisane et jus), et proposer ainsi une technique reproductible pour exprimer la CA globale permettant de comparer et de classer différents échantillons.

CHAPITRE III

MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1 Origines des échantillons

Les 42 échantillons thés et les tisanes testées dans cette maîtrise ont été achetés chez la boutique David's Tea, alors que les 10 jus provenaient d'un supermarché local (Trois-Rivières). Les produits chimiques ont été achetés chez Sigma-Aldrich et VWR International Ltée.

3.2 Préparation des infusions

Les feuilles de thés et de tisanes (masse sèche) ont été pesées à $2,00 \pm 0,005$ g. Ensuite, elles ont été infusées pendant 10 minutes dans 200 mL d'eau du robinet bouillante. Pour minimiser l'évaporation, un couvercle d'une boîte de Pétri a été placé sur le dessus du récipient pendant l'infusion. L'infusion a été refroidie à 37 °C dans un bain-marie. Enfin, 10 mL de l'infusion ont été dilués dans 40 mL d'eau distillée pour constituer la solution mère (Dubeau *et al.*, 2010; Pellegrini *et al.*, 2003). Les infusions des thés et tisanes ont été préparées le jour même des mesures de la CA.

3.3 Séparation des phases aqueuses et organiques des jus

Les jus contiennent généralement une phase solide (ex. pulpe) qui ne peut pas réagir avec les réactifs utilisés dans les différentes méthodes de mesure de CA. Puisque cette phase solide contient des substances qui une fois ingérées avec le jus puis digérées peuvent agir comme antioxydants, les CA des phases liquide et solide ont été mesurées isolément puis additionnées pour estimer la CA totale de jus.

L'extraction des jus a été réalisée selon Sánchez-Moreno et ses collaborateurs (2006). Deux fractions, aqueuse (AQ) et organique (OR provenant de la phase solide en suspension), ont été préparées à partir des jus et utilisées pour la mesure de la CA. Trente grammes de chaque jus ont été mélangés avec 10 mL d'eau et centrifugés à 12 000 rpm pendant 20 min à 4 °C. Le culot a été resuspendu avec 20 mL d'une solution d'eau et centrifugé à 10 000 rpm pendant 15 min à 4 °C. Pour obtenir une fraction aqueuse AQ, les surnageants ont été combinés.

Le culot a été ensuite extrait trois fois avec 20 mL de Tétrahydrofurane (THF) et centrifugé à 10 000 rpm pendant 10 min à 4 °C. Pour obtenir une fraction organique OR (solide), les surnageants ont été combinés. Le solvant dans la phase organique a été évaporé à sec avec un évaporateur rotatif. Le résidu organique a été dissous dans 3 ml d'une solution de Tween 20 (10 % THF) pour constituer la phase solide. (Sánchez-Moreno *et al.*, 2006).

Les CA des deux fractions ont été mesurés séparément. La CA de la phase solide (par unité de volume de jus initial) a été très faible (Tableau 4.4). Pour éviter d'inclure de faibles valeurs dans l'ACP, ces valeurs ont été additionnées à la CA de la phase liquide pour donner la CA totale pour un jus donné.

3.4 Méthodes de dosages de la capacité antioxydante

3.4.1 ABTS

Une première estimation de la CA a été réalisée en utilisant le radical ABTS selon Re et ses collaborateurs (1999) comme suit : 6,6 mg de persulfate de potassium a été ajouté comme agent oxydant à 38,4 mg d'azinobis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate) de sel d'ammonium dans 10 mL d'eau distillée pour former la solution aqueuse d'ABTS. Le mélange a été laissé dans l'obscurité pendant 16 heures. Pour la mesure de CA, 2 mL de la solution ABTS ont été dilués dans 150 mL d'eau distillée afin d'obtenir des valeurs initiales d'absorbance de $0,700 \pm 0,010$ à 734 nm. Ensuite, 150 μ L de l'échantillon ont

été ajoutés dans une cuvette en plastique à 3 ml de la solution d'ABTS et l'absorbance a été lue après 6 min. Une courbe d'étalonnage standard a été construite avec différentes concentrations du Trolox. La CA a été exprimée en équivalent mM Trolox (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC) (Dubeau *et al.*, 2010).

3.4.2 DPPH

La mesure du piégeage du radical DPPH a été effectuée selon la méthodologie décrite par Brand-Williams et ses collaborateurs (1995). Une solution de DPPH à 0,5 mM a été préparée dans l'éthanol quotidiennement. Le mélange réactionnel était composé de 0,5 mL d'échantillon, 3 mL d'éthanol absolu et 0,3 mL de la solution DPPH. Le blanc a été préparé en mélangeant 3,3 mL d'éthanol et 0,5 mL d'échantillon. Alors que le mélange de 3,5 mL d'éthanol et 0,3 mL de la solution de DPPH a servi comme contrôle. L'absorbance a été lue à 517 nm après 30 min de réaction à l'obscurité. La CA a été calculée en pourcentage selon Mensor *et al.* (2001) :

$$AA\% = 100 - ((\text{Abs}_{\text{échantillon}} - \text{Abs}_{\text{blanc}}) \times 100) / (\text{Abs}_{\text{contrôle}})$$

Une courbe d'étalonnage de la vitamine C a été tracée (différentes concentrations de la vitamine C en fonction de leur AA%). Les résultats finaux étaient exprimés en équivalents de vitamine C μM .

3.4.3 FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

Le test de la FRAP a été fait selon Benzie et Strain (1996). Pour préparer la solution FRAP : 10 mM TPTZ (2, 4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine) et 20 mM de chlorure ferrique ont été dilués dans 300 mM de tampon acétate de sodium ajusté à un pH 3,6 avec un ratio 01:01:10. Trois millilitres de la solution FRAP a ont été mis dans une cuvette puis 100 μL de l'échantillon y ont été ajoutés. L'absorbance du mélange a été mesurée à 593 nm après 4 minutes de réaction (Benzie et Strain, 1996).

Le sulfate ferreux heptahydraté $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a été utilisé comme standard à différentes concentrations. La CA a été exprimée en mM FRAP.

3.4.4 Folin-Ciocalteu

La méthode de Folin-Ciocalteu a été réalisée selon Singleton et ses collaborateurs (1999). Vingt-deux millilitres d'eau distillée ont été ajoutés à 10 mL d'extrait d'échantillon et à 2 mL du réactif commercial Folin. Le mélange a été agité et laissé réagir pendant 5 minutes, où 6 mL d'une solution de NaCO_3 (2 g/L) y ont été ajoutés. Le tout a été agité puis laissé réagir pendant 100 minutes à l'obscurité. Ensuite l'échantillon a été centrifugé à 7000 rpm pour 7 minutes à 4 °C. L'absorbance a été mesurée à 760 nm (Dubeau *et al.*, 2010).

Une courbe d'étalonnage standard a été construite avec différentes concentrations d'acide gallique. La CA a été exprimée en mg d'équivalent acide gallique/L.

3.4.5 ORAC rouge pyrogallol (ORAC-RG)

L'ORAC rouge pyrogallol a été réalisé selon Poblete *et al.* (2009). Des solutions mères de rouge pyrogallol à 0,1 mM, d'AAPH à 40 mM et une solution de tampon phosphate à pH = 7,4 (75 mM) ont été préparées et incubées à 37 °C dans un bain-marie. Un mélange réactionnel contenant le rouge de pyrogallol à (5 μM), AAPH (10 mM), a été préparé par le mélange de : 35 mL de tampon phosphate, 2,5 mL de la solution de pyrogallol, 200 μL de l'échantillon ou du standard et enfin 12,5 mL d'AAPH. Après avoir introduit l'AAPH en dernier, l'absorbance a été mesurée toutes les 2 minutes pendant 45 minutes à 540 nm.

Des courbes de décroissance de l'absorbance du rouge de pyrogallol en présence de l'échantillon ou non ont été tracées en fonction du temps, et la différence entre l'aire sous les deux courbes de décroissance a été calculée (Cao, 1998). Le Trolox a été utilisé comme standard, et la CA est exprimée en μM équivalent Trolox (TEAC).

3.4.6 ORAC Peroxydation lipidique (ORAC-PL)

L'ORAC peroxydation lipidique a été réalisé selon Dubeau et ses collaborateurs (2010). Une solution d'acide linoléique à 16 mM a été préparée en ajoutant goutte à goutte 1 g de l'acide linoléique au tampon borate à 0,1 M, pH 9,0 contenant 0,1 M de SDS sous agitation continue. L'oxygène a été chassé du tampon borate par bullage à l'azote pendant 15 minutes afin de minimiser l'oxydation de l'acide linoléique. La solution a été mélangée pendant 10 min et couverte de Parafilm pour assurer sa clarté, et conservée dans un bain-marie à 37 °C sous une atmosphère d'azote.

Le mélange réactionnel a été préparé à 37 °C en ajoutant 50 mL de tampon phosphate salin PBS à 50 mM, pH = 7,4 ont été ajoutés à 500 µL de la solution d'acide linoléique, 130 µL de l'échantillon et 2,5 mL d'une solution AAPH à 8 mM comme générateur de DRO. Le mélange a été agité doucement et des échantillons de 3 mL ont été mis dans une cuvette en quartz et l'absorbance a été mesurée à 234 nm à des intervalles de 5 min pendant 45 min.

La CA a été calculée comme la différence entre les aires sous les courbes d'A234 en fonction du temps de la peroxydation d'acide linoléique mesurée en absence et en présence d'échantillon. (Dubeau *et al.*, 2010). Le Trolox a été utilisé comme standard, la CA est exprimée en µM Trolox.

3.5 Analyses statistiques

Pour arriver à calculer un méta-paramètre de la CA, nous avons réalisé dans une première étape une analyse en composantes principales (ACP) sur la matrice des 52 échantillons X 6 méthodes. L'ACP est une méthode descriptive qui projette les valeurs de la CA de nos 52 échantillons X 6 méthodes dans une nouvelle représentation géométrique. Ainsi, l'examen des plans factoriels permet : i) de visualiser les corrélations entre les méthodes utilisées et donner une orientation sur le choix des

méthodes à retenir pour le calcul du méta-paramètre de la CA (Kourti, 2005), et ii) de mieux comprendre les principaux facteurs contribuant à la variation des valeurs de CA.

Dans une deuxième étape, pour arriver à calculer un méta-paramètre de la CA qui pourrait s'appliquer à tout nouvel échantillon (thés, tisanes, jus) ne figurant pas parmi ceux que nous avons utilisés, nous avons créé une nouvelle variable virtuelle (Y') basée sur les résultats de l'ACP. L'indice Y' a été calculé pour chaque échantillon à partir d'une part de ses coefficients de contribution à la formation de chaque composante (C1, C2) et d'autre part, du pourcentage de la variance expliquée par chaque composante :

$$\text{Indice } Y' = (\text{contribution de l'échantillon selon } C1 \times \% \text{ de variance de la } C1) + (\text{contribution de l'échantillon } C2 \times \% \text{ de variance de la } C2).$$

Finalement, pour le calcul du méta-paramètre de la CA globale, une régression linéaire multiple pas à pas a été réalisée avec les valeurs réelles de la CA des breuvages et l'indice virtuel (Y'). Cette méthode procède par élimination ou ajout consécutif de variables afin de trouver la meilleure équation linéaire de prévision (modèle). Le modèle final est le modèle où toutes les variables sont significatives avec le critère d'information d'Akaike (AICc minimum) le plus faible comme une mesure de la qualité du modèle statistique proposé (Hurvich et Tsai, 1989). L'ACP et la régression linéaire multiple ont été réalisées avec le logiciel JMP 10 (2012, France).

CHAPITRE IV

RÉSULTATS

4.1 Mesures de la capacité antioxydante des thés, tisanes et jus

Dans une première partie de mon projet, les capacités antioxydantes (CA) d'une variété de 52 breuvages (thés, tisanes et jus) ont été évaluées en utilisant 6 méthodes différentes, soit Folin-Ciocalteu, ABTS, FRAP, DDPH, ORAC-RP, ORAC-LP. Le tableau 4.1 présente les valeurs de CA des différents échantillons, accompagnées de leur classement relatif. Le tableau 4.2 montre les moyennes ainsi que les déviations standards pour les sept types de breuvages (les thés verts, Oolong, blancs, noirs, Pu-erh, les tisanes et les jus) et ce pour les 6 méthodes utilisées.

Les valeurs de CA présentées dans le tableau 4.1 montrent de larges variations au sein d'une même méthode ainsi qu'entre les méthodes. Tout d'abord, si l'on considère les valeurs de CA estimées par la méthode Folin-Ciocalteu par exemple, la valeur maximale mesurée pour le thé vert Sencha Ashikubo (3.56 mg GAE/ L) est 17,8 fois supérieure à la valeur minimale trouvée, soit celle de la tisane Baies Toniques (0,20 mg GAE/ L). Une si large variation dans les valeurs de CA des différents échantillons est souhaitable pour donner plus de robustesse aux analyses statistiques et ainsi mieux mettre en évidence les facteurs qui expliquent ces variations.

Une autre observation pouvant être faite d'un examen sommaire des résultats concerne le classement des différents types de breuvages en termes de CA. Un tel classement est intéressant même s'il ne constitue pas un objectif de ce projet. Globalement, malgré quelques différences entre les méthodes, on remarque que pour nos échantillons, le classement par moyenne des différents types de breuvages allant des plus antioxydants vers les moins antioxydants est le suivant : thés noirs, thés verts, thés Pu-erh, thés Oolong, thés blancs, jus et les tisanes (Tableau 4.3).

En plus des larges différences entre les CA des échantillons et des types de breuvages estimées par une seule méthode, il importe de remarquer des différences notables entre les CA provenant de différentes méthodes. Une telle différence inter-méthodes peut être illustrée de deux façons. Tout d'abord, le classement d'un breuvage peut varier grandement selon la méthode utilisée. Par exemple, le jus de bleuets pur se classe au 5^e rang selon la méthode ORAC-LP et au 27^e rang selon la méthode FRAP. Inversement, le thé vert Sejak coréen se trouve au 4^e rang selon les méthodes Folin-Ciocalteu et ABTS, mais au 16^e rang avec la méthode ORAC-LP (Tableau 4.1).

De telles variations dans le classement d'un échantillon selon les méthodes influencent aussi le classement moyen de la CA des types de breuvages (Tableau 4.2). Par exemple, les thés blancs se trouvent au 3^e rang selon les méthodes Folin-Ciocalteu et ABTS, mais au 7^e rang pour la méthode DPPH. Autre exemple, les jus se classent 4^{es} avec la méthode ORAC-RP, mais au 7^e rang pour le FRAP (Tableau 4.3).

Une dernière observation à noter au sujet des CA des différents échantillons concerne celles des jus. Ceux-ci contenaient tous une fraction solide en suspension, et donc inaccessible lors des dosages de la CA en milieux aqueux. Pour estimer leur contribution à la CA totale d'un jus, la fraction solide de chacun des jus a été récoltée, de laquelle les composés hydrophobes ont été extraits par un solvant organique. Les deux valeurs de CA (solide et liquide) ont été additionnées pour chacun des jus et utilisées pour les analyses statistiques afin de mieux représenter les propriétés globales des jus.

Tableau 4.1

Les valeurs de CA des différents échantillons pour les 6 méthodes utilisées

Breuvages	Folin-Ciocalteu		ABTS		FRAP		DPPH		ORAC-RP		ORAC-LP	
	mg GEA/L		mM Trolox		mM CFeSO47H2O		µg vit C/L		µM Trolox		µM Trolox	
Thés verts												
	Valeur	Rang	Valeur	Rang	Valeur	Rang	Valeur	Rang	Valeur	Rang	Valeur	Rang
Sencha Ashikubo	3,56	1	1,77	1	6,01	3	174,37	2	394,46	1	402,61	1
Sejak coréen	3,01	4	1,52	4	5,76	5	148,10	5	184,88	14	285,29	16
Puits du dragon	1,53	24	0,80	15	3,05	28	87,46	26	194,00	10	328,64	7
Perles de dragon	3,02	3	1,54	3	5,92	4	144,29	7	184,50	15	340,32	6
Papillon au jasmin	1,84	19	0,69	21	5,02	10	90,66	23	175,00	23	302,61	11
Matcha matsu	1,21	33	0,28	45	1,73	46	56,15	43	105,42	41	174,48	41
Gyokuro yamashiro	1,98	15	0,74	17	4,41	12	152,30	4	187,18	13	313,04	8
Genmaicha	0,57	48	0,12	50	1,99	43	60,60	39	163,43	30	229,79	30
Genmai Hojicha	0,37	49	0,14	49	0,87	52	46,46	50	69,25	47	117,25	47
Dragon de soie	2,57	8	1,58	2	4,67	11	129,70	12	176,53	21	269,89	17

Breuvages	Folin-Ciocalteu		ABTS		FRAP		DPPH		ORAC-RP		ORAC-LP	
	mg GEA/L		mM Trolox		mM CFeSO47H2O		µg vit C/L		µM Trolox		µM Trolox	
Thés Oolong												
	Valeur	Rang	Valeur	Rang	Valeur	Rang	Valeur	Rang	Valeur	Rang	Valeur	Rang
Oolong au lait	1,37	29	0,53	26	3,60	22	61,65	37	137,91	37	285,39	15
Tung ting	0,70	45	0,33	40	2,77	32	50,79	46	104,96	42	213,14	35
Oolong au ginseng	1,47	27	0,42	35	3,76	20	117,77	14	166,49	29	239,74	24
Tieguanyin	1,15	36	0,50	28	3,36	26	80,64	30	106,56	40	168,93	42

Breuvages	Folin-Ciocalteu		ABTS		FRAP		DPPH		ORAC-RP		ORAC-LP	
	mg GEA/L		mM Trolox		mM CFeSO47H2O		µg vit C/L		µM Trolox		µM Trolox	
Thés blancs												
	Valeur	Rang	Valeur	Rang	Valeur	Rang	Valeur	Rang	Valeur	Rang	Valeur	Rang
Tiges argentées	1,88	18	0,81	14	3,44	25	49,09	49	154,54	37	166,43	43
Pivoine blanche	1,49	26	0,76	16	2,80	31	71,50	34	155,38	42	183,28	40
Bai hao yin zhen	1,34	30	0,47	31	3,52	23	86,73	27	157,83	29	254,57	20

Breuages	Folin-Ciocalteu		ABTS		FRAP		DPPH		ORAC-RP		ORAC-LP	
	mg GEA/L		mM Trolox		mM CFeSO47H2O		µg vit C/L		µM Trolox		µM Trolox	
Thés noirs												
	Valeur	Rang	Valeur	Rang	Valeur	Rang	Valeur	Rang	Valeur	Rang	Valeur	Rang
Darjelling first flush	3,14	2	1,49	5	6,05	2	182,20	1	366,11	2	376,20	2
Darjelling second flush	2,61	7	1,37	6	5,21	7	158,70	3	314,00	3	369,31	3
Perles noires au jasmin	2,79	5	0,74	18	4,31	13	115,48	15	174,08	25	291,61	12
Thé noir gyokuro	2,62	6	0,88	11	3,69	21	109,39	17	187,95	12	307,21	9
Lapsang souchang étoilé	2,48	9	1,07	7	5,20	8	115,07	16	248,56	4	355,15	5
Thé noir sauvage de yunnan	2,40	10	0,73	19	3,96	16	130,56	11	198,29	9	306,44	10
Thé noir de Népal	2,35	11	0,91	9	3,89	17	139,56	9	216,30	6	361,08	4
Earl Grey	2,33	12	0,91	10	5,04	9	123,31	13	172,62	26	268,83	18
Kenyan Tinderet	2,20	13	0,84	13	6,16	1	137,44	10	176,84	19	249,02	21
Assam de banaspaty	1,99	14	0,88	12	4,03	15	146,52	6	174,92	24	225,48	32
Mélange himalayen	1,95	16	0,70	20	3,86	18	140,72	8	175,92	22	291,42	13
Lapsang souchang	0,74	43	0,07	52	2,02	42	60,04	40	67,87	48	113,43	48

Breuvages	Folin-Ciocalteu		ABTS		FRAP		DPPH		ORAC-RP		ORAC-LP	
	mg GEA/L		mM Trolox		mM CFeSO47H2O		µg vit C/L		µM Trolox		µM Trolox	
Thés Pu-erh												
	Valeur	Rang	Valeur	Rang	Valeur	Rang	Valeur	Rang	Valeur	Rang	Valeur	Rang
Pu'erh sheng	1,73	21	0,66	23	3,76	19	105,27	20	177,60	18	243,00	23
Pu'erh doré	1,40	28	0,54	25	3,02	29	87,76	25	182,66	17	231,99	27

Breuvages	Folin-Ciocalteu		ABTS		FRAP		DPPH		ORAC-RP		ORAC-LP	
	mg GEA/L		mM Trolox		mM CFeSO47H2O		µg vit C/L		µM Trolox		µM Trolox	
Tisanes												
	Valeur	Rang	Valeur	Rang	Valeur	Rang	Valeur	Rang	Valeur	Rang	Valeur	Rang
Guayusa biologique	0,72	44	0,33	41	1,76	45	54,82	44	70,32	46	125,01	46
Rooibos vert	1,91	17	0,96	8	5,71	6	87,86	24	156,61	33	286,92	14
Rooibos biologique	1,84	20	0,62	24	2,72	34	105,33	19	159,37	31	234,19	26
Punch à l'hibiscus	1,73	22	0,32	42	3,48	24	105,91	18	101,05	43	197,64	37
Super gingembre biologique	1,51	25	0,50	29	4,08	14	94,88	21	170,09	27	243,47	22
Menthe verte	0,75	41	0,34	39	2,34	37	73,99	33	88,33	44	157,64	44
Myrte citronnée	0,74	42	0,21	46	1,66	48	71,09	36	79,21	45	135,34	45
Amour menthé poivrée	0,66	46	0,16	48	2,56	36	49,77	48	65,88	49	69,69	51
Bravissimo	0,37	50	0,18	47	1,08	51	38,81	51	50,10	52	26,35	52
Camomille égyptienne	0,29	51	0,28	44	1,70	47	50,40	47	54,08	51	89,89	50
Baies tonique	0,20	52	0,09	51	1,23	50	31,08	52	31,08	50	94,38	49

Breuvages	Folin-Ciocalteu		ABTS		FRAP		DPPH		ORAC-RP		ORAC-LP	
	mg GEA/L		mM Trolox		mM CFeSO47H2O		µg vit C/L		µM Trolox		µM Trolox	
Jus												
	Valeur	Rang	Valeur	Rang	Valeur	Rang	Valeur	Rang	Valeur	Rang	Valeur	Rang
Jus de bleuets purs	1,50	23	0,64	22	2,95	27	85,71	22	234,85	5	243,98	19
Jus de canneberges	1,26	31	0,50	27	2,54	35	69,76	32	178,07	11	217,95	25
Garden cocktail tomates	1,14	34	0,38	37	2,82	30	81,27	28	199,64	7	215,59	28
Jus de grenades	1,20	32	0,40	36	2,18	38	74,95	31	169,10	20	207,11	33
Tropicana jus d'orange	1,17	35	0,43	34	2,17	40	77,44	29	175,40	16	214,09	29
Jus de tomates sans additifs	1,01	37	0,44	33	2,64	33	68,33	34	193,59	8	210,00	31
Jus de carottes	0,96	38	0,45	32	2,17	39	53,31	42	164,08	28	204,36	34
Oasis fruits et légumes	0,84	39	0,47	30	2,08	41	48,72	45	126,20	38	187,62	36
Smoothies mangue	0,72	40	0,29	43	1,89	44	58,60	38	133,53	36	181,30	38
Jus de pomme	0,61	47	0,34	38	1,41	49	55,00	41	110,99	39	175,76	39

Tableau 4.2

Moyenne de la CA de différentes catégories de breuvages pour les 6 méthodes utilisées

Catégories de breuvages	Folin-Ciocalteu mg GEA/L	ABTS mM Trolox	FRAP mM CFeSO ₄ 7H ₂ O	DPPH µg vit C/L	ORAC-RP µM Trolox	ORAC-LP µM Trolox
Thés verts	1,96 ± 1,01	0,91 ± 0,60	3,94 ± 1,79	109 ± 43,81	183,46 ± 80,19	276,4 ± 79,2
Oolong	1,17 ± 0,29	0,44 ± 0,07	3,37 ± 0,37	77,71 ± 25,47	128,98 ± 25,39	226,8 ± 42,2
Thés blancs	1,57 ± 0,22	0,68 ± 0,14	3,25 ± 0,32	69,11 ± 15,45	155,5 ± 1,75	201,4 ± 38,2
Thés noirs	2,3 ± 0,56	0,88 ± 0,33	4,45 ± 1,10	129,91 ± 28,69	206,12 ± 72,76	292,9 ± 71,3
Pu-erh	1,56 ± 0,16	0,60 ± 0,06	3,39 ± 0,37	96,51 ± 8,75	180,13 ± 2,53	237,5 ± 5,5
Tisanes	0,97 ± 0,61	0,36 ± 0,23	2,57 ± 1,32	69,44 ± 25,22	96,35 ± 42,58	150,9 ± 77,6
Jus	1,09 ± 0,26	0,44 ± 0,09	2,31 ± 0,46	69,57 ± 12,59	173,62 ± 36,7	201,5 ± 21,7

Tableau 4.3

Classement des moyennes de différentes catégories pour les 6 méthodes utilisées

Catégories de breuvages	Folin-Ciocalteu mg GEA/L	ABTS mM Trolox	FRAP mM CFeSO ₄ 7H ₂ O	DPPH µg vit C/L	ORAC-RP µM Trolox	ORAC-LP µM Trolox
Thés verts	2	1	2	2	2	2
Thés Oolong	5	5	4	4	6	4
Thés blancs	3	3	5	7	5	6
Thés noirs	1	2	1	1	1	1
Thés Pu-erh	4	4	3	3	3	3
Tisanes	7	7	6	6	7	7
Jus	6	5	7	5	4	5

4.2 Matrice de corrélations entre les méthodes de la capacité antioxydante

De manière générale, les valeurs de CA des 52 breuvages (thés, tisanes et jus) qui ont été évaluées en utilisant 6 méthodes différentes (Folin-Ciocalteu, ABTS, FRAP, DDPH, ORAC-RP, ORAC-LP) sont bien corrélées (avec des valeurs de R^2 entre celles-ci allant de 0,477 à 0,853). Pour déterminer celles fournissant des informations similaires (donc redondantes) et celles qui donnent des informations complémentaires,

nous avons tout d’abord calculé la matrice de corrélation entre les 6 méthodes présentées dans tableau 4.4.

Les coefficients de corrélations hautement significatives ont été observés entre les méthodes Folin-Ciocalteu avec celles de l’ABTS et du FRAP, pour des valeurs R^2 de 0,853 et 0,801 respectivement. Les plus faibles coefficients ont été trouvés entre l’ORAC-RP vs ABTS, DPPH et FRAP, avec des valeurs de R^2 de 0,577, 0,477 et 0,573 respectivement.

Les résultats du tableau 4.4 sont cohérents avec ceux du tableau 4.1, suggérant que les méthodes ne sont pas toutes équivalentes pour estimer la CA, et qu’il y a des méthodes similaires et d’autres complémentaires. D’après les coefficients de corrélation, il semble avoir deux groupes de méthodes, les deux méthodes ORAC d’une part et les quatre autres méthodes d’autre part. En effet, les deux méthodes ORAC sont assez bien corrélées entre elles, mais peu avec les quatre autres méthodes, et vice versa.

Tableau 4.4

Matrice des coefficients de corrélation R^2 entre les valeurs provenant des six différentes méthodes d’estimation de la CA

	Folin-Ciocalteu	ABTS	FRAP	DPPH	ORAC-RP	ORAC-LP
Folin-Ciocalteu	1	0,835	0,801	0,797	0,591	0,704
ABTS		1	0,730	0,667	0,577	0,604
FRAP			1	0,707	0,477	0,627
DPPH				1	0,573	0,643
ORAC-RP					1	0,746
ORAC-LP						1

4.3 Analyse en composantes principales

Pour tenter de mieux identifier les principaux facteurs contribuant à la variation des valeurs de CA selon les échantillons et les méthodes utilisées, nous avons effectué

dans notre deuxième partie expérimentale une analyse en composantes principales (ACP) à partir de la matrice de données des 52 breuvages \times 6 méthodes.

L'examen du plan factoriel de l'ACP (Figure 4.1) obtenu permet en premier lieu de constater que 92,2 % de la variance initiale est expliquée par les deux premières composantes, dont 84,9 % par la composante principale 1 (axe horizontal), et 6,64 % par la composante principale 2 (axe vertical). En second lieu, l'ACP permet de visualiser la répartition des valeurs de CA des différents échantillons qui se présentent sous forme de points, en fonction des composantes 1 et 2. Les variables contribuant le plus à la formation des axes sont celles dont les coordonnées sur ces axes (1 ou 2) sont les plus élevées. En se déplaçant de gauche à droite (valeurs croissantes sur cet axe 1), on remarque globalement que les différents types des breuvages (tisanes, jus, thés) sont distribués selon le même ordre croissant de la CA de ces différents types (Tableau 4.1), soit les tisanes à la gauche de l'axe 1 (valeurs négatives), puis les jus, les thés blancs et Oolong, et enfin les thés verts et noirs à la droite de l'axe 1 (valeurs positives).

En ce qui concerne l'axe 2, il est facile de remarquer que toutes les tisanes se situent dans la partie inférieure (valeurs négatives), tandis que tous les jus se trouvent sans exception dans la partie supérieure (valeurs positives). Quant aux valeurs des autres types de breuvages, elles sont distribuées plutôt indépendamment de l'axe 2.

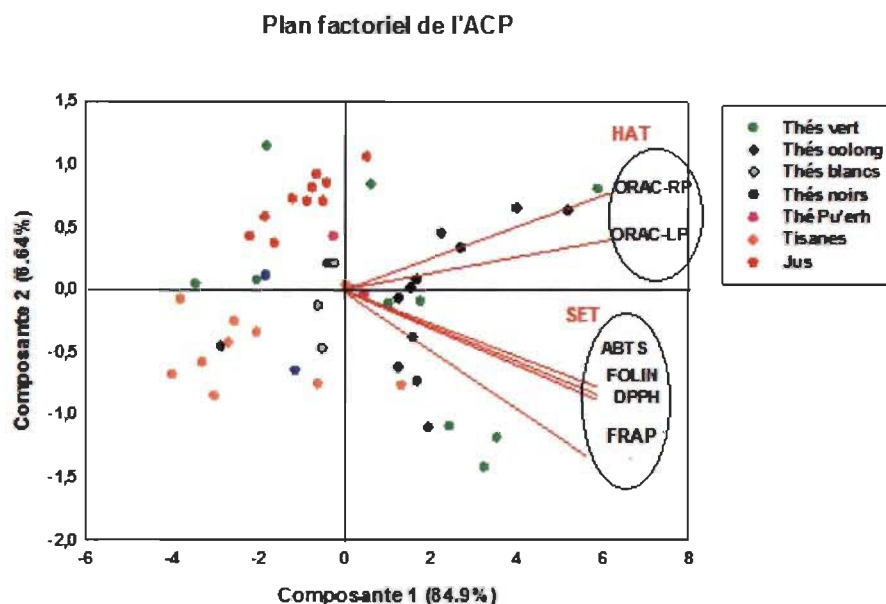


Figure 4.1 Plan factoriel de l'ACP effectuée sur les valeurs de capacité antioxydante de 52 échantillons (thés, tisanes et jus) estimées par 6 méthodes différentes.

Après l'examen de la distribution des breuvages (points), la disposition des vecteurs représentant les 6 méthodes sur l'ACP fournit aussi des informations importantes pour comprendre les facteurs expliquant la CA de nos échantillons. Tout d'abord, tous les vecteurs représentant les méthodes sont orientés dans la même direction, pointant vers la partie positive de l'axe 1. Elles sont assez éloignées de 0, et les angles qu'elles forment sont inférieurs à 90 °C. Ceci suggère que les méthodes donnent globalement la même information, étant toutes positivement corrélées. Puisque 1) tous les vecteurs des méthodes sont orientés du même côté de l'axe de la composante principale 1 (axe1 horizontal), 2) les valeurs des CA sont distribuées sur cet axe selon un gradient croissant de la CA des différents types de breuvages, et 3) l'axe 1 représente facteur expliquant le plus (84 %) la CA, il est aisé de suggérer que cet axe représente la teneur en antioxydants d'un échantillon (la concentration de métabolites antioxydants), teneur qui déterminerait le plus la CA de cet échantillon.

Pour ce qui est de l'axe 2 (vertical), il est intéressant de noter que les vecteurs des méthodes sont répartis en deux groupes : les deux méthodes ORAC (RP et LP) dans la partie supérieure de l'axe 2, et les quatre autres méthodes (FRAP, Folin-Ciocalteu, ABTS, DPPH) dans la partie inférieure. Cette disposition des méthodes concorde avec la matrice des coefficients de corrélation (Tableau 4.4).

Il est intéressant de noter que ces deux groupes de méthodes reposent sur des mécanismes de réaction d'oxydo-réduction différents, soit le type de réaction HAT ou transfert d'atome d'hydrogène pour les deux méthodes ORAC, et le type de réaction SET ou transfert simple d'un électron pour les quatre autres méthodes. Par conséquent, l'axe 2 représente donc assez clairement le type de réaction d'oxydo-réduction impliqué dans le dosage de la CA : transfert d'un atome d'hydrogène.

4.4 Analyse en régression linéaire multiple

L'ACP est grandement utile pour faciliter l'interprétation des principaux facteurs expliquant la variance entre les valeurs de CA provenant de différents types d'échantillons et obtenues par différentes méthodes. De plus, nous avons utilisé davantage les résultats de l'ACP en calculant un indice « virtuel » de la CA dénoté Y' , indice qui servira de base au calcul par régression multiple pas-à-pas d'un méta-paramètre de la CA qui pourrait s'appliquer à tout nouvel échantillon (thés, tisanes, jus) ne figurant pas parmi ceux que nous avons utilisés.

Pour ce faire, nous avons ainsi créé cet indice virtuel Y' de CA basé sur les coordonnées (ou projections) des différents échantillons (points) sur les axes 1 et 2 de l'ACP. Ces coordonnées ont ensuite été pondérées selon les pourcentages de la variance expliquée par chaque axe (CP1 et CP2). Pour éliminer les valeurs négatives des coordonnées se trouvant sur la partie gauche de l'axe 1 et inférieure de l'axe 2, la valeur positive de la valeur minimale (ex. : -3,97) a été ajoutée à chaque valeur (ex. : $-3,97 + 3,97 = 0$; $2,01 + 3,97 = 5,98$, etc.), et ce, pour chaque axe. Ainsi, pour chaque échantillon, l'indice Y' a été calculé ainsi :

$$Y' = ((\text{valeur positive de la valeur minimale sur CP1} + \text{valeur de l'échantillon sur CP1}) \times 84,9 \%) + ((\text{valeur positive de la valeur minimale sur CP2} + \text{valeur de l'échantillon sur CP2}) \times 6,64 \%).$$

Les valeurs de l'indice virtuel Y' ont été calculées pour chacun des 52 échantillons, puis placées dans la matrice des valeurs « réelles » de CA de ces échantillons estimées par les 6 méthodes.

Une régression linéaire multiple pas à pas, utilisant l'indice Y' comme variable à prédire, et les valeurs « réelles » de CA estimées par les 6 méthodes comme variables prédictives a ensuite été réalisée en utilisant l'AICc minimum (critère d'information d'Akaike, une mesure de la qualité du modèle statistique proposé) comme règle d'arrêt. Ceci a permis le calcul du méta-paramètre de la CA globale, dénoté ici CA' , par une régression linéaire multiple pas à pas. Cette régression procède par élimination et/ou ajout consécutif de variables (ici les variables sont les méthodes) afin de choisir parmi elles lesquels à insérer à priori dans le modèle de méta-paramètre.

Tout d'abord, la régression multiple pas à pas a identifié les valeurs de CA provenant de la méthode Folin-Ciocalteu ($CA_{\text{Folin-Ciocalteu}}$) comme première variable explicative. À elles seules, les $CA_{\text{Folin-Ciocalteu}}$ pouvaient prédire Y' avec un R^2 de 0,919 et un AICc de 90.0. Ensuite la seconde variable explicative retenue par la régression pas-à-pas fut la CA obtenue de la méthode ORAC-RP ($CA_{\text{ORAC-RP}}$). En combinant les valeurs de $CA_{\text{Folin-Ciocalteu}}$ et de $CA_{\text{ORAC-RP}}$, la variable Y' pouvait être largement expliquée avec un R^2 de 0,971, et un AICc de 47.1. L'addition d'une troisième variable (CA mesurée par FRAP) ajoutait peu au modèle, augmentant le R^2 à 0,986 (diminuant l'AICc à 4.6). La définition claire des axes 1 et 2 de l'ACP, ainsi que le faible gain prédictif apporté par les mesures de CA_{FRAP} , justifient l'utilisation que des variables $CA_{\text{Folin-Ciocalteu}}$ et $CA_{\text{ORAC-RP}}$ pour le calcul du méta-paramètre CA' selon l'équation suivante :

$$CA' = -0,632 + (1,594 \times CA_{\text{Folin-Ciocalteu}}) + (0,009 \times CA_{\text{ORAC-RP}})$$

Le tableau 4.5 montre le nouveau classement des breuvages selon le méta-paramètre de mesure de CA. Le thé vert Sencha Ashikubo est le breuvage le plus antioxydant dans notre série de breuvages suivit des deux thés noirs darjeeling first et second flush. Les jus aussi sont mieux classés qu'avec les quatre méthodes SET, c.-à-d. Folin-Ciocalteu, ABTS, FRAP et DPPH.

Le tableau 4.6 représente le nouveau classement par les moyennes des types de breuvages qui s'établit maintenant ainsi : noirs > verts > Pu-erh > blancs > jus > Oolong > tisanes. Ce classement diffère du précédent qui changeait selon la méthode utilisée (Tableau 4.3), qui était globalement comme suit : noirs > verts > Pu-erh > Oolong > blancs > jus > les tisanes. Les jus comme mentionné plus haut sont mieux classés, alors que les tisanes sont demeurées les moins antioxydantes.

Tableau 4.5

Classement de la CA de différents échantillons calculée avec le méta-paramètre de mesure de CA global

Breuvages	Catégories	Valeurs de CA	Classement
Sencha Ashikubo	Vert	8,59	1
Darjeeling first flush	Noir	7,66	2
Darjeeling second flush	Noir	6,35	3
Perles de dragon	Vert	5,84	4
Sejak coréen	Vert	5,82	5
Lapsang souchong étoilé	Noir	5,55	6
Perles noires au jasmin	Noir	5,38	7
Thé noir gyokuro	Noir	5,23	8
Thé noir de Népal	Noir	5,09	9
Dragon de soie	Vert	5,05	10
Sauvage de yunnan	Noir	4,97	11
Earl Grey	Noir	4,63	12
Kenyan Tinderet	Noir	4,46	13
Gyokuro yamashiro	Vert	4,20	14
Assam de banaspaty	Noir	4,11	15
Jus de bluets purs	Jus	4,08	16
Mélange himalayen	Noir	4,05	17

Breuvages	Catégories	Valeurs de CA	Classement
Papillon au jasmin	Vert	3,87	18
Rooibos vert	Tisane	3,82	19
Tiges argentées	Blanc	3,74	20
Rooibos biologique	Rooibos	3,73	21
Pu'erh sheng	Pu-erh	3,72	22
Puits au dragon	Vert	3,55	23
Super gingembre bio	Tisane	3,30	24
Pu'erh doré	Pu-erh	3,24	25
Garden cocktail tomates	Jus	3,22	26
Oolong au ginseng	Oolong	3,20	27
Jus de canneberges	Jus	3,17	28
Pivoine blanche	Blanc	3,14	29
Punch à l'hibiscus	Tisane	3,03	30
Jus de grenades	Jus	2,93	31
Bai hao yin zhen	Blanc	2,92	32
Jus tomate sans additifs	Jus	2,91	33
Tropicana jus d'orange	Jus	2,90	34
Oolong au lait	Oolong	2,79	35
Jus de carottes	Jus	2,52	36
Matcha matsu	Vert	2,24	37
Tieguanyin	Oolong	2,16	38
Oasis fruits et légumes	Jus	1,97	39
Smoothies mangue	Jus	1,85	40
Genmaicha	Vert	1,74	41
Jus de pomme	Jus	1,42	42
Tung ting	Oolong	1,42	43
Menthe verte	Tisane	1,35	44
Myrte citronnée	Tisane	1,26	45
Lapsang souchang	Noir	1,15	46
Guaysa biologique	Tisane	1,14	47
Amourmenthé poivrée	Tisane	1,01	48
Genmai Hojicha	Vert	0,58	49
Bravissimo	Tisane	0,40	50
Camomille égyptienne	Tisane	0,31	51
Baies tonique	Tisane	0,27	52

Tableau 4.6

Classements des moyennes de la CA des catégories des échantillons
selon le méta-paramètre de mesure de CA global

Catégories	Moyenne	Classement
Thés noirs	$4,88 \pm 1,47$	1
Thés verts	$4,15 \pm 2,20$	2
Thés Pu-erh	$3,48 \pm 0,24$	3
Thés blancs	$3,27 \pm 0,34$	4
Jus	$2,70 \pm 0,73$	5
Thés Oolong	$2,39 \pm 0,67$	6
Tisanes	$1,78 \pm 1,33$	7

CHAPITRE V

DISCUSSION ET CONCLUSION

Pour se protéger contre les effets nocifs de l'oxygène, les organismes aérobiques ont développé des systèmes de défense pouvant réguler la concentration cellulaire des DRO initiés par l'oxydation de l'oxygène. Ces systèmes de défense reposent sur des composantes enzymatiques (ex. : superoxyde dismutase, catalase, peroxydase...), et non-enzymatiques, les « antioxydants » (ex. : vitamines C, E, polyphénols...). Le rôle des antioxydants principalement d'origine végétale dans la prévention des cancers et des maladies neurodégénératives ont incité les consommateurs au cours des dernières années à porter de plus en plus attention aux produits alimentaires riches en antioxydants. Ainsi, la consommation de thés, tisanes et jus est en augmentation, à cause de leur teneur élevée en antioxydants, particulièrement les polyphénols (Wu *et al.*, 2004). Ces derniers sont connus pour leurs rôles de protection des cellules contre les dommages des DRO (Miller et Rice-Evans, 1999, Pellegrini *et al.*, 2005). Donc, disposer d'une méthode à la fois rapide et précise pour la quantification du pouvoir antioxydant est essentielle à la fois pour estimer la réponse des végétaux aux facteurs de stress environnementaux ainsi que pour fournir une information importante sur la qualité nutritionnelle des aliments, au même titre que les apports en calories, protéines, etc.

Cependant, à cause de la complexité des processus d'oxydo-réduction impliqués (transfert d'un électron ou d'un atome d'hydrogène) et la nature diversifiée à la fois des DRO et des antioxydants, il n'y a pas de méthode universelle par laquelle la capacité antioxydante (CA) peut être estimée d'une façon à la fois globale et précise. En effet, il existe plutôt une large gamme de méthodes, ce qui complique la comparaison des valeurs de CA trouvées dans la littérature. De plus, ces méthodes reposent sur différents mécanismes chimiques, soit des réactions d'oxydo-réduction impliquant un transfert d'atome d'hydrogène (HAT, Hydrogen Atom Transfer) ou bien un transfert d'électron (SET, Single Electron Transfer). Ainsi, l'utilisation d'une seule méthode pour évaluer la

CA est insuffisante pour prendre en compte les différents aspects de la CA (Huang *et al.*, 2005; Antolovich *et al.*, 2002). Donc, on ne peut pas comparer ou donner un classement quantifié de la CA de différents échantillons ou aliments, ou encore recommander officiellement des antioxydants spécifiques en raison de l'absence d'une méthode standard. Mais alors, comment choisir les méthodes à utiliser? Puis comment combiner les résultats de CA obtenus à partir de différentes méthodes de dosage?

Dans ce contexte, mon projet de maîtrise cherchait à définir un méta-paramètre pouvant estimer globalement les différents aspects de la CA s'appliquant à différents types de thés, tisanes et jus. Pour ce faire, j'ai d'abord estimé les CA des 52 échantillons par 6 méthodes de dosage les plus utilisées. Des analyses statistiques (matrice des corrélations, l'analyse multivariée en composantes principales (ACP), et puis une régression linéaire pas à pas) ont permis tout d'abord de sélectionner les méthodes les plus pertinentes, c.-à-d. complémentaires et ainsi éviter celles étant redondantes, et ensuite de définir une équation simple utilisant les CA estimées par deux méthodes seulement pour déterminer un méta-paramètre pouvant exprimer la CA globale de 52 breuvages (thés, tisanes et jus).

5.1 Mesure de la capacité-antioxydante des thés, tisanes et jus

Dans une première partie de ce projet, les capacités antioxydantes (CA) d'une variété de 52 breuvages (thé, tisanes et jus) ont été évaluées en utilisant 6 méthodes différentes (Folin-Ciocalteu, ABTS, FRAP, DDPH, ORAC-RP et ORAC-LP). Les résultats montrent qu'il existe de larges différences de CA entre les échantillons, qui peuvent varier par presque un facteur 20. Parmi nos échantillons, les tisanes avaient les plus faibles valeurs de CA (à l'exception des Rooibos) tandis que les thés noirs et verts étaient les plus antioxydants. Il importe de rappeler que l'objectif de ce mémoire n'était pas de classer les types de breuvages utilisés en fonction de leur CA. Pour cela, il aurait été nécessaire d'avoir un plus grand nombre d'échantillons provenant de diverses origines. Notre objectif était plus fondamental, soit d'estimer efficacement et de façon fiable les différents aspects de la CA des breuvages (thé, tisanes et jus).

Il est connu qu'en général, la CA de thés verts est plus élevée que celles des thés blancs, noirs, et Oolong (Benzie et Szeto 1999; Richelle *et al.*, 2001; Yen *et al.*, 1995). Les différences de CA s'expliquent à la fois par des différences de concentrations en polyphénols ainsi que par différents degrés d'oxydation de ces derniers. En effet, les thés noirs, Oolong et Pu-erh subissent une perte partielle de leur concentration en polyphénols lors de la fermentation. Effectivement, pendant cette fermentation, les flavanols des feuilles de thé vert (principalement les catéchines et leurs esters gallique) subissent une polymérisation oxydative par la polyphénol oxydase (enzyme qui déclenche la fermentation) conduisant ainsi à la formation des nouvelles substances notamment les théaflavines et les théarubigines avec une perte partielle de la CA (Haslam, 2003; Gong *et al.*, 2012; Benzie *et al.*, 1999).

Néanmoins, dans nos échantillons, les CA des thés noirs étaient légèrement supérieures à celles des thés verts. Ceci peut s'expliquer par le fait que certains thés verts utilisés étaient aromatisés (grains de riz) ou encore moulu (matcha matsu), ce qui a pu diminuer leur CA.

En accord avec notre travail, des études antérieures comme celle d'Alarcon et collaborateurs (2008) ont montré que les infusions (tisanes) contiennent moins de composés phénoliques que les thés. Dans une étude d'Aoshima et collaborateurs (2007), la CA de thés verts était plus haute que celle de la menthe poivrée et de camomille (tisanes). Ces auteurs ont montré aussi une corrélation linéaire ($R = 0,950$) entre la concentration en polyphénols estimée avec la méthode Folin-Ciocalteu et la CA des thés mesurée avec la méthode DPPH. La valeur de R^2 entre les CA estimés par ces deux méthodes était de 0,797 pour nos échantillons.

Un autre exemple de l'importance de concentration en polyphénols (estimée avec la méthode Folin-Ciocalteu) d'un échantillon dans sa valeur de CA est fourni par Cai et collaborateurs (2004), qui ont mesuré la CA de 112 espèces de plantes médicinales chinoises. Ils ont montré une forte corrélation ($R^2 = 0,93$) entre la teneur en polyphénols totaux (estimée par Folin-Ciocalteu) et l'activité antioxydante estimée par la méthode

ABTS. Le R^2 entre ces deux méthodes était de 0,835 pour nos échantillons. De même, une étude de Katalinic et collaborateurs (2006) a démontré une forte corrélation entre la teneur en polyphénols mesurée avec la méthode Folin-Ciocalteu et la CA mesurée par FRAP de 70 extraits de plantes médicinales.

Si les tisanes présentent généralement de faibles valeurs de CA, nos résultats montrent qu'une tisane se démarque par un haut potentiel antioxydant, soit le rooibos souvent nommé thé rouge. Celui-ci contient de nombreux flavonoïdes, y compris une dihydrochalcone unique, l'aspalathine. Son activité antioxydante est directement liée à sa teneur en ce dernier (Von Gadow *et al.*, 1997). Selon Joubert et collaborateurs (2004), l'efficacité de l'aspalathine contre le radical DPPH est supérieure à celui du Trolox et similaire à celle de la quercétine.

Cependant, nos résultats contredisent ceux rapportés par certains auteurs comme Lai Leung Kwok et collaborateurs (2001), qui suggèrent que les flavines dans les thés noirs possèdent le même potentiel antioxydant de catéchines présentes dans les thés verts. Quant à l'étude de Yen et Chen (1995), ils suggèrent que les thés semi-fermentés (Oolong) sont plus antioxydants que les thés fermentés (noirs) et non fermentés (verts et blancs). Ou encore, une analyse menée par Hilal (2010) sur 64 différents types de thés (30 thés blancs et 34 thés verts) provenant de Chine, du Japon, et d'Inde, qui démontre que les concentrations en polyphénols des thés blancs sont légèrement supérieures des thés verts.

Les études citées ci-haut affirment que les variations dans les valeurs de CA s'expliquent selon les types de breuvages, qui eux montrent différentes concentrations en polyphénols et autres antioxydants. Il importe de prendre note que le classement des CA varie non seulement le type de breuvages (et leur concentration en antioxydants) mais aussi selon la méthode appliquée. Les classements des CA de nos échantillons estimés par les méthodes SET (Folin-Ciocalteu, ABTS, FRAP et DDPH) sont assez semblables, mais ces classements étaient fort différents lorsque les CA étaient mesurées par les deux méthodes HAT, soit ORAC-RP et ORAC-LP (Tableau 4.1).

Il est facile de constater sur le plan factoriel de l'ACP (Figure 4.1) que plus que l'échantillon est situé dans la partie positive de l'axe 2, plus il réagit favorablement avec les méthodes ORAC. Les jus sont tous dans cette partie positive, et la CA des jus est mieux classée avec ORAC-RP (4^e position) que les méthodes SET (6, 5, 7, et 5^e position). Ceci peut être expliqué par leur forte proportion en flavonoïdes. Ces derniers ont la propriété de donation d'atomes d'hydrogène disponibles dans les substituants hydroxyles de leurs groupes phénoliques (Sandhar *et al.*, 2011, Fernandez de Simon *et al.*, 1992; Block et Langseth, 1994).

Le jus de bleuets purs démontre la CA la plus élevée parmi les jus selon toutes les méthodes. Ceci concorde avec les travaux d'Halvorsen et collaborateurs (2002), qui ont mesuré la CA de 310 produits alimentaires, boissons, épices, herbes et suppléments les plus consommés dans le monde entier par la méthode FRAP. Le jus de bleuets était le plus antioxydant à cause de sa haute teneur en anthocyanes et polyphénols totaux.

De même, une étude de Wu et collaborateurs (2004) a démontré que la CA des bleuets mesurée avec ORAC fluorescéine (ORAC-FL), ABTS et Folin-Ciocalteu était la plus élevée sur plus de 100 types différents d'aliments, y compris les fruits, les légumes, les noix, les fruits secs, les épices, les céréales. À noter, cette étude a démontré une très faible corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et la CA mesurée par ORAC-FL. Ceci est donc cohérent avec nos résultats présentés au tableau 4.4.

Parmi notre série de jus, le jus de pomme avait la plus faible CA. Pourtant la pomme en tant que fruit est connue pour ses vertus antioxydantes. Une étude de Nagasako Akazome et collaborateurs (2007) a montré qu'une consommation quotidienne pendant 12 semaines de capsules de polyphénols (600 mg) extraits des pommes chez l'humain, diminue le cholestérol, les lipoprotéines de basse densité (LDL) et le gras viscéral. Toutefois, Van Der Sluis et ses collaborateurs (2006) expliquent la faible CA de jus de pomme par diminution de contenu en polyphénols lors de sa fabrication. Leur résultat démontre une diminution de niveaux de flavonoïdes (3 % des catéchines et 50 % pour l'acide chlorogénique (acide phénolique)).

Dans la littérature, beaucoup d'études montrent que les propriétés antioxydantes d'un produit végétal sont fortement liées à sa teneur en polyphénols (Das *et al.*, 1997; Cai *et al.*, 2004; Majchrzak *et al.*, 2004; Zujko *et al.*, 2005; Pellegrini *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007; Aoshima *et al.*, 2007). Le potentiel antioxydant de ces derniers est dû à leurs propriétés redox, qui leur permettent d'agir comme agents réducteurs, des donneurs d'hydrogène ou d'électron et des chélateurs de métaux (Kaur et Kapoor, 2002).

Le pouvoir antioxydant des polyphénols est attribué à la structure catéchol de l'anneau benzoïque, de la position des doubles liaisons et de la quantité de groupements hydroxyles. L'explication réside dans le fait que ces structures favorisent la délocalisation d'électrons et/ou d'hydrogène (Yamasaki *et al.*, 1997).

De plus, le système catéchol des polyphénols peut donner un électron à un oxydant. Le cathéchol oxydé perd ensuite un proton (H^+) pour former un radical phénoxyne non toxique pour les cellules, empêchant ainsi le déclenchement de réactions d'oxydation en chaîne dans les cellules vivantes (Kehrer et Smith, 1994). On peut prendre l'exemple de flavonoïdes qui peuvent non seulement inhiber la production des DRO par la formation d'une liaison avec les enzymes impliquées dans la production de ces derniers (Cotelle, 2001), mais aussi, stopper la peroxydation lipidique par piégeage des radicaux peroxydes et arrêter ainsi l'oxydation en chaîne (Bors *et al.*, 1992).

De même, les polyphénols représentent de bons chélateurs d'ions métalliques positifs en échange d'un ou deux protons par l'ion métallique (Ferrali *et al.*, 1997). Verdan *et al.* (2011) ont démontré que le potentiel antioxydant des flavonoles (quercétine, myricétine et morine) est dû en partie à leurs pouvoirs de fixer différents métaux (Fe^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+}).

Il est intéressant de noter que la concentration en polyphénols des végétaux, qui détermine une grande partie de leur capacité antioxydante, dépend de nombreux facteurs tels que les conditions climatiques, le moment de récolte, le mode de stockage (Capecka *et al.* 2005) ou la partie utilisée pour l'infusion (Carnat *et al.*, 1998; Ivanova *et al.*, 2005;

Mantle *et al.*, 2000). Ainsi, les propriétés antioxydantes et la teneur en polyphénols des jus peuvent varier grandement selon la maturité et des cultivars de fruits et légumes récoltés (Wolfe *et al.*, 2003).

Les processus d'industrialisation (ramassage, transport, et la technique de conservation) diminuent également la teneur en polyphénols (Schwartz *et al.*, 2009). Effectivement, l'épluchage est une des premières étapes qui affecte la teneur en polyphénols des fruits et des légumes, en particulier pour les flavonoïdes et les anthocyanes, qui sont concentrés dans les parties épidermiques des végétaux. Par exemple, 50 % des polyphénols sont concentrés dans l'épiderme dans la pomme (Guyot *et al.*, 2003).

Par ailleurs, une autre étape majeure influençant la concentration en polyphénols est le traitement thermique. Ce dernier cause une destruction des membranes des plastes et les membranes cytoplasmiques des cellules, ce qui entraîne l'accès de l'oxygène et la libération des enzymes oxydases tel que la polyphénol oxydase conduisant ainsi à l'oxydation des polyphénols et la perte de leur pouvoir antioxydant (O'Connel et Fox, 1999). Par exemple, le processus de pasteurisation du jus qui implique un traitement thermique à 90 °C pendant 1 min (Mermelstein, 1999) peut diminuer la concentration en anthocyanes (Skrede, Wrolstad *et al.*, 2000), et en vitamines C et E (Abushita *et al.*, 2000). Dans les dernières années, les chercheurs ont proposé le traitement à haute pression comme alternative du traitement thermique, qui permet de conserver la CA des légumes et fruits grâce à l'effet d'inactivation du polyphénol oxydase, prévenant ainsi l'oxydation des polyphénols (Torres et Velazquez, 2005).

Enfin, l'étape de stockage n'est pas neutre et peut affecter la concentration en polyphénols. Par exemple, il a été rapporté que le jus d'orange dans l'emballage en verre montre une faible rétention de vitamine C et perd 10 % de la concentration en vitamine C après quatre mois de stockage (The Ultimate citrus, 2004).

5.2 Analyse en composantes principales

Afin d'identifier les principaux facteurs expliquant la variation des valeurs de la CA selon les échantillons et les méthodes utilisées, nous avons effectué dans la deuxième partie de ce projet une analyse en composantes principales (ACP).

Tout d'abord, les résultats de la matrice de corrélation ainsi que l'ACP montrent que les méthodes forment deux groupes distincts selon les types de réaction d'oxydo-réduction impliquée. En effet, les méthodes de type SET (Folin-Ciocalteu, ABTS, FRAP et DDPH) sont relativement bien corrélées et sont proches dans le plan factoriel de l'ACP (présentes dans les parties positives de l'axe 1 et négative de l'axe 2). L'autre groupe est formé deux méthodes HAT, soit ORAC-RP et ORAC-LP (Tableau 4.1), elles aussi mieux corrélées entre elles qu'avec les autres méthodes, et bien discriminées selon l'axe 2 de l'ACP (présentes dans les parties positives des axes 1 et 2).

Conformément à nos résultats, des études antérieures telles que celle de Gorinstein et ses collaborateurs (2010) a rapporté une forte corrélation entre la teneur en polyphénols de fruits exotiques mesurée avec Folin-Ciocalteu et les CA mesurées par ABTS, DPPH et FRAP. Sanchez et collaborateurs (2007) ont montré également une forte corrélation entre Folin-Ciocalteu utilisée pour mesurer la teneur totale en polyphénols et quatre méthodes (ABTS, DPPH, ORAC-FL, système modèle carotène-linoléate utilisées) pour déterminer la CA des 39 huiles d'olive extra vierge, était de ($R^2 = 0,892, 0,805, 0,779, 0,725$) respectivement. Dudonne et ses collaborateurs (2009) ont indiqué une forte corrélation positive entre ABTS et dosages DPPH avec un coefficient de $R = 0,906$ pour 30 extraits aqueux des différents végétaux. Par ailleurs, les travaux de Kim et ses collaborateurs (2003) ont constaté que la CA mesurée par ABTS était fortement corrélée avec la teneur totale en composés phénoliques mesurée par Folin-Ciocalteu, avec une faible corrélation entre la CA et la teneur en flavonoïdes dans les prunes.

Tous ces résultats indiquent que les polyphénols contribuent fortement à la CA des aliments, et qu'ils ont des propriétés redox leur permettant d'agir en tant qu'agents donateurs d'hydrogène et d'électron à la fois (Manach *et al.*, 2005).

En contradiction avec nos résultats qui montrent une corrélation faible entre ORAC-RP et Folin-Ciocalteu, Wada et Ou (2002) ont signalé qu'il y avait une corrélation élevée entre le contenu phénolique mesuré par Folin-Ciocalteu et la valeur ORAC dans les framboisiers. Dans cette optique, de nombreuses études ont également rapporté une forte corrélation entre la teneur totale polyphénols et la méthode ORAC. Une corrélation hautement significative chez les bleuets en corymbes entre la valeur ORAC et Folin-Ciocalteu ($R = 0,87$) (Ehlenfeldt et Prior, 2001), chez la patate douce ($R^2 = 0,937$) (Teow *et al.*, 2007). Huang, Ou et Avant (2005) ont expliqué que le degré élevé de corrélation entre les valeurs ORAC et la teneur en polyphénols mesurée par Folin-Ciocalteu s'explique par leur capacité à céder un atome d'hydrogène facilement, donc cette capacité est mieux exprimée par l'ORAC dont le mécanisme se base sur le transfert d'hydrogène (HAT).

Les résultats présentés dans ce mémoire démontrent qu'il y a des méthodes similaires et d'autres complémentaires. Ces méthodes diffèrent par leur mécanisme (SET, HAT), leurs réactions chimiques (différents radicaux sont utilisés comme cible) et par leur méthode de calcul. Toutefois, aucune de ces méthodes à elle seule ne suffit pour estimer adéquatement les différents aspects de la CA d'un échantillon.

En effet, plusieurs auteurs insistent sur la nécessité de caractériser la CA des aliments par combinaison de plusieurs méthodes, ce qui permet une meilleure validation des résultats (Pellegrini *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005; Stratil *et al.*, 2006). Ils soulignaient également l'importance de trouver un consensus quant au choix des méthodes à utiliser pour uniformiser les études et pouvoir ainsi standardiser les résultats (Antolovich *et al.*, 2002; Frankel et Meyer, 2000).

D'autre part, l'examen de la représentation géométrique obtenue par l'ACP a permis en premier lieu de constater que tous les vecteurs des 6 méthodes sont orientés dans le même sens, contribuant ainsi à la formation de la composante principale 1 avec un pourcentage de variance de 84,9 %. Ceci indique que l'axe 1 représente le principal facteur contribuant à la CA d'un échantillon. À ce titre, on peut l'interpréter comme la concentration de métabolites antioxydants. La dispersion des breuvages confirme d'ailleurs cette interprétation puisqu'on retrouve les plus antioxydants à droite sur le plan factoriel, les plus faibles comme les tisanes à gauche.

Quant à la composante principale 2 qui explique 6,64 % de la variance totale, on note que les deux méthodes ORAC (HAT) sont assez proche, les deux situées dans la partie positive de l'axe, contrairement aux quatre autres méthodes SET. Ceci suggère que l'axe 2 représente le type de réaction d'oxydo-réduction impliqué dans le dosage de la CA : le transfert d'un atome d'hydrogène. En outre, la disposition des jus (qui se trouvent dans la partie supérieure positive de cette composante et proche des deux vecteurs ORAC) connus par la forte proportion des flavonoïdes, qui ont la propriété de donation d'atomes d'hydrogène disponibles dans les substituants hydroxyles de leurs groupes phénoliques (Sandhar *et al.*, 2011) supporte notre interprétation.

Enfin, les résultats de l'ACP permettent de démontrer que la mesure de la CA des breuvages dépend de plusieurs facteurs, dont bien entendu la concentration en antioxydants (polyphénols). Ainsi qu'à leur nature diversifiée, avec des propriétés hydrophile ou hydrophobe (il y a des méthodes qui sont adaptées aux antioxydants hydrophiles, lipophiles ou les deux à la fois), et de leur mécanisme d'action (capacité à céder un atome d'hydrogène ou un électron).

Toutefois, il faut prendre en compte que cette ACP représente la distribution de la CA des différents breuvages (thés, tisanes et jus). La présence dans cette analyse de différentes classes d'aliments tels que des fruits et légumes frais, des graines et noix,

des huiles et boissons alcoolisées pourrait modifier les conclusions de l'ACP, en mettant en évidence un facteur potentiel non révélé par nos 52 échantillons.

5.3 Analyse en régression linéaire multiple pas à pas

Afin de choisir sur une base rationnelle et quantitative les méthodes à utiliser parmi une large gamme de méthodes pour estimer adéquatement le pouvoir antioxydant des aliments ou des plantes, je propose dans cette maîtrise un méta-paramètre pouvant estimer de façon globale la CA de n'importe quel échantillon (thés, tisanes, jus), même ceux qui ne figurent pas parmi ceux que nous avons utilisés. Fait intéressant, notre modèle de méta-paramètre obtenu avec l'analyse de régression linéaire multiple pas à pas (Stepwise) a retenu une méthode SET (Folin-Ciocalteu) et une méthode HAT (ORAC-rouge pyrogallol).

Il faut noter que d'après Prior et collaborateurs (2005), il y a des facteurs qu'il faut respecter pour choisir la méthode à utiliser pour la mesure de CA. La première considération est que son mécanisme de réaction soit bien défini (SET ou HAT) et qu'elle soit adaptable pour le dosage des antioxydants hydrophiles et lipophiles à la fois. Toutefois, dans la littérature, il y a souvent de la confusion et de l'attribution erronée de mécanismes réactionnels lors de la mesure de la CA (Prior *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005). En réalité les réactions de transfert d'électrons et de transfert d'atome d'hydrogène peuvent se produire en parallèle, donc il est difficile de les distinguer. C'est pour cette raison qu'il faut combiner plusieurs méthodes pour mesurer la CA (Huang *et al.*, 2005, Serram *et al.*, 2008).

La seconde considération, c'est d'avoir un temps de réaction suffisant pour que les réactions d'oxydo-réduction atteignent le point de terminaison. Ce qui n'est pas le cas des méthodes de FRAP et ABTS, étant donné que leur temps de réaction ne dépasse pas les quatre et six minutes respectivement (Huang *et al.*, 2005). Enfin, il faut que la méthode utilise un radical biologique, ce qui est reproché aux méthodes ABTS et DPPH, qui ne représentent pas des radicaux physiologiques (Van den Berg *et al.*, 1999).

Ainsi, notre modèle de méta-paramètre a choisi les méthodes Folin-Ciocalteu et ORAC-rouge pyrogallol non seulement en tenant compte du critère d'information d'Akaike le plus faible, et le coefficient de corrélation le plus haut entre les deux méthodes, mais aussi de façon cohérente avec les recommandations mentionnées plus haut. En effet, l'ORAC-RP est une méthode HAT, qui mesure la CA des antioxydants hydrophiles et lipophiles à la fois. De plus, l'utilisation de radicaux peroxydes générés à partir du AAPH peut refléter plus étroitement l'action *in vivo* en raison de leur prédominance dans les cellules (Prior *et al.*, 2005). Quant à la méthode Folin-Ciocalteu (SET), elle mesure la concentration des composés phénoliques ainsi que la CA, étant donné que son principe est une réaction d'oxydo-réduction (Huang *et al.*, 2005). De plus, elle est simple, rapide, peu coûteuse et ne nécessite pas un équipement spécialisé (Prior *et al.*, 2005).

Qui plus est, notre modèle corrobore les recommandations de « First International Congress on Antioxidant Method » en 2004, qui recommande l'utilisation de trois méthodes ABTS, Folin-Ciocalteu et ORAC sans toutefois préciser comment combiner les valeurs de ces trois méthodes. Ce que notre modèle combine quantitativement deux de ces méthodes recommandées en un seul méta-paramètre.

À la lumière de ce qui est mentionné plus haut, il est raisonnable de suggérer l'utilisation de notre modèle de méta-paramètre comme un outil efficace pour exprimer adéquatement la CA globale et qui peut prendre en compte les différents aspects de la CA de divers breuvages (thés, tisanes et jus) même ceux qui ne figurent pas dans notre liste d'échantillons.

5.4 Conclusion

Bien qu'il existe une vaste gamme de méthodes pour déterminer la CA de divers produits alimentaires et biologiques, il n'y avait pas jusqu'à présent un consensus entre les auteurs pour le choix de ces méthodes. Cela est en raison que les composés antioxydants sont multifonctionnels, c'est-à-dire qu'ils peuvent être hydrophiles et

hydrophobes à la fois. Ainsi que de la complexité des processus de réactions d'oxydo-réductions impliquées. Donc, à ce jour il n'y avait pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise.

Le but principal de cette maîtrise était d'identifier parmi 6 méthodes de mesure de CA les plus utilisées, celles qui sont complémentaires, afin de choisir celles pouvant exprimer le mieux les différents aspects de la CA de nos breuvages (thés, tisanes et jus). À notre connaissance, cette étude est la première à utiliser les résultats de l'analyse en composante principale (ACP) pour calculer un méta-paramètre de CA global.

Dans la première partie de ce projet, les résultats démontrent de larges variations au sein de nos breuvages ainsi qu'un classement différent selon les méthodes, cela en raison de leurs différentes concentrations en antioxydants et du type de réaction d'oxydo-réduction impliqué.

Dans la seconde partie, l'analyse en composante principale (ACP) a permis de constater que toutes les méthodes sont plus ou moins bien corrélées à cause de différents aspects de la CA. Donc une seule méthode ne suffit pas pour l'exprimer.

Enfin, en utilisant les résultats de l'ACP, un méta-paramètre de CA globale a été calculé par une régression pas à pas. Ce dernier peut être utilisé pour exprimer adéquatement la CA de différent type de breuvages (thés, tisanes et jus) même ceux qui ne figurent pas dans notre liste d'échantillons.

Notre projet de maîtrise propose un méta-paramètre de CA qui représente un protocole utile pour la mesure de CA, avec une approche méthodologique précise simple, rapide, et peu coûteuse. De plus, notre approche va permettre de réduire le temps au laboratoire, et fournir des comparaisons significatives d'aliments ou produits commerciaux.

Cependant, à la lumière de nos résultats nous suggérons à des collègues qui voudraient reprendre cette expérimentation d'analyser des jus naturels (extraits au laboratoire) qui peuvent présenter une phase solide plus importante. De même, faire des extractions avec différents solvants à partir de produits frais (fruits et légumes). Une étude de Pérez-Jiménez et Saura-Calixto (2006) a signalé que la CA dépend de solvant utilisé. Ces éléments pourront renforcer les résultats de l'ACP et l'estimation future de la capacité antioxydante des tissus végétaux et des aliments. Enfin, augmenter le nombre d'échantillons ou ajouter de nouveaux échantillons solides afin d'avoir une plus grande base de données que la nôtre et calculer un nouveau méta-paramètre de CA.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abushita A. A., Daood H. G., & Biacs P. A. 2000. Change in carotenoids and antioxidant vitamins in tomato as a function of varietal and technological factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2075-2081.
- Alarcón E., Campos A.M., Edwards A.M., Lissi E., López Alarcón C. 2008. Antioxidant capacity of herbal infusions and tea extracts: A comparison of ORAC-fluorescein and ORAC-pyrogallol red methodologies. *Food Chem.*, 107: 1114-1119.
- Almajano M.P., Carbó R., Limenéz A.L., Gordon M.H., 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chem.*, 108, 55-63.
- Alscher R. G., Erturk N., Heath L. S. "Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants". *J. Exp. Biol.* 2002; 531(1): 1331-134.
- Anese M., Manzocco L., Nicoli M.C., Lerici C.R, 1999. Antioxidant properties of tomato juice as affected by heating *J Sci Food Agric*, 79: 750-754.
- Antolovic M., Prenzler, P.D., Patsalides E., McDonald S., Robards K., 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183-198.
- Aoshima H., Hirata S., Ayabe S., 2007. Antioxidative and anti-hydrogen peroxide activities of various herbal teas. *Food Chemistry*, 103: 617-622.
- Apel K, Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.*, 55: 373-99.
- Arnao MB. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals:a practice case. *Tr Food Sc Tehnol.* 2000; 11(11): 419-421.
- Arora A, Byrem TM, Nair MG, Strasburg GM., 2000. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Arch Biochem Biophys* 373: 102-109.
- Asada K., 2000. The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355: 1419-1431.
- Asada K. 1992. Ascorbate peroxidase a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Plant Physiology* 85, 235-241.

- Atoui, A. K., Mansouri A., Boskou G., Kefalas, P. 2005. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89: 27-36.
- Awika J.M., Rooney L.W., Wu X., Prior R.L., Cisneros-Zevallos, L. Screening, 2003. Methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 6657-6662.
- Badenhorst P.W., Amory A.M., Hockett B.I, 1998. Light regulation of native and *Escherichia coli* glutathione reductase in transgenic tobacco. *Journal of Plant Physiology* 152(4-5): 502-509.
- Baier M, Ströher E, Dietz KJ. 2004. The acceptor availability at photosystem I and ABA control nuclear expression of 2-Cys peroxiredoxin-A in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 45, 997-1006.
- Baker A, Graham I., 2002. Plant Peroxisomes. *Biochemistry, Cell Biology and Biotechnological Applications*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Barghoorn E.S., Tyler S.A. 1965. Microfossils from the gun flint. *Science*, 147.
- Bertini I., Mangani S., Viezzoli S. 1998. Structure and properties of copper-zinc superoxide dismutases. *Adv. Inorg. Chem.* 45: 127-250.
- Benzie I.F.F., Strain J.J, 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76.
- Benzie, I.F.F., Szeto Y.T., 1999. Total antioxidant capacity of teas by ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.* 47: 633-636.
- Berger M.M., 1997. Antioxidant functions of micronutrients in the general population and critically ill patients. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 11(2): 125-132.
- Berger M.M., 2006. Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20: 48-53.
- Blanchet G., Legendre P., Borcard D. 2008. Forward selection of explanatory variables. *Ecology*, 89(9), 2008, pp. 2623-2632.
- Block G. and Langseth L., 1994. Antioxidant vitamins and disease prevention. *Food Technol* 48: 80-84.

- Bors W, Heller W, Michel C. & Saran M., 1990. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*, 186: 343-355.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C., 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 28. 25-30.
- Bruneton, J. 1993. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Technique et Documentation Lavoisier. 915.
- Cadenas E., 1989. Biochemistry of oxygen toxicity, *Ann. Rev Biochem*, 58: 79-110.
- Cadenas E., & Sies H. (1998). The lag phase. *Free. Radic. Res.*, 28, 601-609.
- Cai Y., Luo Q., Sun M., Corke H., 2004. Antioxidant activity phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Science* 74: 2157-2184.
- Cao G., Russell R.M., Lischner N., Prior R.L., 1998. Sérum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *J.Nutr.* 128: 2383-2390.
- Cao G., Prior R. L., 1999. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods Enzymol.*, 299: 50-62.
- Cano A., Alcaraz O., AcostaM., Arnao M.B., 2002. Antioxidant activity determination: comparaison of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity using the ABTS•+ assay. *Redox Report*, 7: 103-109.
- Capecka E., Mareczek A., Leja M., Antioxidant activity of fresh and herbs of some Lamiaceae species. *Food Chem.*, 2005, 93, 223-226.
- Castelluccio C, Paganga G, Melikian N, Bolwell GP, Pridham J, Sampson J, Riceevans C. 1995. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higherplants. *Febs Letters* 368: 188-192.
- Carnat A.P., Carnat A., Fraisse D., Lamaison J.L., The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. *Pharm. Acta Helv.*, 1998, 72, 301-305.
- Carbera C, Artacho R, Gimenez R. Beneficial effects of green tea-A review. *Journal of the American College of Nutrition*. 2006; 25(2): 79-99.

- Carr AC., McCall MR., Frei B., 2000. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*; 20(7): 1716-23.
- Chiueh CC., Pekka Rauhala, 1999. The redox pathway of *S*-nitrosoglutathione, glutathione and nitric oxide in cell to neuron communications. *Free Radical Research*, 31, Issue 6.
- Chamorro A., Planas A.M., Muner D.S., Deulofeu R., 2004. Uric acid administration for neuroprotection in patients with acute brain ischemia *Medical Hypotheses*, 62: 173-176.
- Ciz M., Cizova H., Denev P., Kratchanova M., Slavov A., & Lojek, A., 2010. Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. *Food Control*, 21, 518-523.
- Colonna S., Gaggero N., Drabowicz J., Lyzwa P., Mikołajczyk M., 1999. The first efficient bovine serum albumin catalyzed asymmetric oxidation of tertiary amines to the corresponding N-oxides via kinetic dynamic resolution. *Chemical Communications*, 21: 1787-1788.
- Cotelle, N. 2001. Role of flavonoids in oxidative stress. *Current topics in medicinal chemistry*, 1: 569-590.
- Crichton R. R., Wilmet S., Legssyer R., Ward R.J, 2002. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 91(1): 9-18.
- Christopher R., Nyandoro S.S., Chacha M., De Koning C.B. 2014. A new cinnamoylglycoflavonoid, antimycobacterial and antioxidant constituents from *Heritiera littoralis* leaf extracts. *Natural Product Research*, 28(6): 351-358.
- Curtin J.F., Donovan M., Cotter TG., 2002. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods*, 265: 49-72.
- Dangles, O., 2006. The physico-chemical properties of polyphenols how do they relate to their roles in plants, foods and human health. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 17: 64-67.
- Dal Corso G., Pesaresi P., Masiero S., Aseeva E., Schünemann D., Finazzi, G., Joliot, P., Barbato, R., Leister, D., 2008. A Complex Containing PGRL1 and PGR5 Is Involved in the Switch between Linear and Cyclic Electron Flow in *Arabidopsis*. *Cell*, 132(2, 25): 273-285.

- Dalle-Donne. 2006. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*, 52: 601-623.
- Das M., Vedasiromoni J.R., Chauhan S.P.S., Ganguly D.K., Effect of green tea (*Camellia sinensis*) extract on the rat diaphragm. *J. Ethnopharmacol.*, 1997, 57, 197-201.
- Davey M.W., Gilot C., Persiau G., Ostergaard J., Han Y., Baw., 1999. Ascorbate biosynthesis in *Arabidopsis* cell suspension culture *Plant Physiology*, 121(2): 535-543.
- Delannoy E., P. Marmey, C. Penel, and M. Nicole. 2004. Les peroxydases végétales de classe III. *Acta Bot. Gall.* 151: 353-380.
- Dhalla N.S., Temsah R.M., Netticadan T., 2000. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases, 655-673.
- Dixon RA, Paiva NL (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* 7: 1085-1097.
- Del Río Luis A., Luisa M. Sandalio, Francisco J. Corpas, José M. Palma, Juan B. Barroso, 2006. Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Peroxisomes. Production, Scavenging, and Role in Cell Signaling. *Plant Physiol.*; 141(2): 330-335.
- Del Río LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Gómez M, Barroso JB (2002) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J Exp Bot* 53: 1255-1272.
- Droge W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, 82, 47-95.
- Du Y., Guo H., Lou H., 2007. Grape seed polyphenols protect cardiac cells from apoptosis via induction of endogenous antioxidant enzymes. *J. Agric. Food. Chem.*, 55, 1695-1701.
- Dubeau S., Samson G., Tajmir-Riahi HA., 2010. Dual effect of milk on the antioxidant capacity of green, Darjeeling, and English breakfast teas. *Food Chemistry*, 122: 539-545.
- Dudonne S., Vitrac X., Woillez P.C.R. & Jean-Michel M., 2009. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1768-1774.

- Dunford H.B., 2002. Oxidations of iron (II)/ (III) by hydrogen peroxide: from aquo to enzyme Biophysical Chemistry. *Chemistry Reviews*: 233-/234, 311-318.
- Duh P.D., Yen G.C., Yen W.J., Wang B.S., & Chang L. W., 2004. Effects of pu-erh tea on oxidative damage and nitric oxide scavenging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8169-8176.
- Edreva A., 2005. The importance of non-photosynthetic pigments and cinnamic acid derivatives in photoprotection. *Agr. Ecosyst. Environ*, 106: 135-146.
- Ehlenfeldt, M.K., Prior, R.L., 2001. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry. *J. Agric. Food Chem.*, 49(5): 2222-2227.
- El-Agamey A, Lowe GM, McGarvey DJ, Mortensen A, Phillip DM, Truscott TG, Young AJ., 2004. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-antioxidant properties. *Arch Biochem Biophysics* 430: 37-48.
- Erman JE, Vitello LB., 2002. Yeast cytochrome c peroxidase: mechanistic studies via protein engineering. *Biochim Biophys Acta.*, 1597(2): 193-220.
- Fernández de Simon B., Pérez-Illarbe J., Hernández T., Gómez-Cordovés C., Estrella, I., 1992. Importance of phenolic composition for the characterization of fruit juices. *J. Agric. Food Chem*, 40: 1531-1535.
- Fowler D, K. Pilegaard , M.A. Sutton, P. Ambus , M. Raivonen, J. Duyzer, D. Simpson, H. Fagerli, S. Fuzzi, J.K. Schjoerring, C. Granier, A. et al., 2009. Atmospheric composition change: Ecosystems-Atmosphere interactions. *Atmospheric Environment* 43: 5193-5267.
- Foyer CH, Noctor G., 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ* 28: 1056-1071.
- Frankel E. N., Meyer A. S, 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multidimensional food and biological antioxidants. *Journal of Science and Food Agriculture*, 80: 1925-1941.
- Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, Sugherini L, Ciccoli L, Giachetti D, Comporti M. 1997. Protection against oxidative damage of erythrocyte membranes by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *Febs Lett*, 416: 123-129.

- Friedman, M. 2007. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Mol Nutr Food Res* 51: 116-134.
- Fuhrman, B., A. Lavy, and M. Aviram. 1995. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Amer. J. Clin. Nutr.* 61: 549-554.
- Ishige, K.; Schubert, D.; Sagara, Y., 2001. Flavonoids protect neuronal cells from oxidant stress by three distinct mechanisms. *Free Radical Biol. Med.*, 30: 433-446.
- Iriti M, Faoro F., 2003. Benzothiadiazole (BTH) Induces Cell-Death Independent Resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. *Phytopathology*, 151: 171-180.
- Ghafourifar P, Cadenas E., 2005. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci.*, 26(4): 190-5.
- Ghiselli A, Serafini M, Maiani G, Azzini E, Ferro-Luzzi A., 1995. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radic Biol Med.*, 18(1): 29-36.
- Gong Jia-shun, Chao Tanga, Chun-xiu Peng. 2012. Characterization of the chemical differences between solvent extracts from Pu-erh tea and Dian Hong black tea by CP-Py-GC/MS. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 95:189-197.
- Gold, M. H., Alic, M. 1993. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiol. Rev.* 57: 605-622.
- Girotti A.W., 1998. Lipid hydroperoxide generation, turnover and effector action in biological systems. *J. Lipid Res.*, 36: 1529-1542.
- Gorinstein S., Haruenkit R., Poovarodom S. Vearasilp S., Ruamsuke P., Namiesnik, J., Leontowicz M., Leontowicz H., Suhaj M., Sheng, G.P., 2010. Some analytical assays for the determination of bioactivity of exotic fruits. *Phytochemical Analysis*, 21: 355-362.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M., 2000. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.*, 17; 86(5): 494-501.
- Gutteridge J.M.C., 1995. Lipid-peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue-damage, *Clin.Chem.* 41: 1819-1828.

- Guyot S., Marnet N., Sanoner P., Drilleau JF., 2003. Variability of the polyphenolic composition of cider apple (*Malus domestica*) fruits and juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 6240-6247.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1999. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd. ed. Oxford: Oxford University Press.
- Halliwell B., 1999. How to characterize biological antioxidant. *Free Rad. Res. Comm.*, 9: 1-32.
- Haslam, E., 2003. Thoughts on thearubigins. *Phytochem.* 64: 61-73.
- Hebrard M., 2010. Etude des systèmes antioxydants dans le métabolisme et la virulence de *Salmonella typhimurium*. Thèse de doctorat : Microbiologie moléculaire et Biotechnologie. Université de la Méditerranée, Aix-Marseille II : 130 p.
- Heber David, 2004. Vegetables, fruits and phytoestrogens in the prevention of diseases. *Journal of postgraduate medicine*, 50: 145-149.
- Hertog MG., Feskens EJ., Hollman PC., Katan MB., Kromhout D., 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. (8878): 1007-11.
- Hertwig B, Streb P, Feierabend J., 1992 Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. *Plant Physiol* 100: 1547-1553.
- Horner, N.K., Kristal, A.R., Prunty, J., Skor, H.E., Potter, J.D., Lampe, J.W., 2002. Dietary determinants of plasma enterolactone. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 11: 121-126.
- Hilal Yumen; recherche sur les polyphénols dans le thé vert et blanc, 2010. Cuvillier-Verlag, p. 34.
- Hilvorsen BL, Carlsen MH, Phillips KM, Bohn SK, Holte K, Jacobs DR Jr, Blomhoff R., 2006. Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *Am J Clin Nutr.*; 84: 95-13.
- Hraga, S., K. Sasaki, H. Ito, Y. Ohashi, and H. Matsui. 2001. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol.* 42: 462-468.

- Hermes-Lima, M., Zenteno-Savín, T., 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp Biochem Phys C* 133, 537-556.
- Huang D., Ou B., Prior RL., 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem*, 53: 1841-1856.
- Hurvich C. M., Tsai C.-L. 1989. Regression and time series model selection in small samples. *Biometrika*, 76: 297-307.
- Karori, S., M. Wachira, F. N., Wanyoko, J. K., Ngure, R. M., 2007. Antioxidant capacity of different types of tea products. *African Journal of Biotechnology* Vol. 6(19), pp. 2287-2296.
- Kaur, C., Kapoor, H.C., 2002. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some asian vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 37: Pages 153-161.
- Kim Dae-Ok, Seung Weon Jeong, Chang Y. Lee, 2003. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry* 81: 321-326.
- Katalinic V., M. Milos, T. Kulisic, M. Jukic, 2006. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry* 94(2006) 550-557.
- Kehrer JP., Smith CV., 1994. Free radicals in biology: Sources, reactivity, and role in the etiology of human diseases, in *Natural Antioxidants in Human Health and Disease* (Frei B ed). Academic Press, New York: 25-62.
- Kilmartin PA, Zou H, Waterhouse AL 2001. A cyclic voltammetric method suitable to characterise antioxidant properties of wine and wine phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 1957-1965.
- Kourti, T., 2005. Application of latent variable methods to process control and multivariate statistical process control in industry. *International Journal of Adaptive Control and Signal Processing*, 19, 213-246.
- Kuo, C.C., Fattor, J.A., Henderson, G.C., & Brooks, G.A. (2005). Lipid oxidation in fit young adults during postexercise recovery. *Journal of Applied Physiology*, 99(1), 349-356.
- Jones RD, Hancock JT, Morice AH., 2000. NADPH oxidase: a universal oxygen sensor? *Free Radic Biol Med* 29: 416-424.

- Joubert, E.; Winterton, P.; Britz, T.J.; Ferreira, D., 2004. Superoxide anion and α - α -diphenyl- β -picrylhydrazyl radical scavenging capacity of rooibos (*Aspalathus linearis*) aqueous extracts, crude phenolic fractions, tannin and flavonoids. *Food Res. Int.*, 37, 133-138.
- Lai Kwok Leung, Yalun Su, Ruoyun Chen, Zesheng Zhang, Yu Huang, Zhen-Yu Chen, 2001. Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. *J. Nutr.* 131, 2248-2251.
- Lebart L., Morineau A., Warwick K., 1984. *Multivariate Descriptive Statistical Analysis*. J. Wiley, New York.
- Leenen R., Roodenburg A.J., Tijburg L.B., Wiseman S.A., 2000. A single dose of tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans. *Eur J Clin Nutr.*, 54(1): 87-92.
- Lambers, H., F.S. Chapin III and T.L. Pons. 1998. *Plant physiological ecology*. Springer-Verlag, Berlin, 540.
- Lemanska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zielinski, R., Soffer, A., Rietjens, I., 2001. The influence of pH on the antioxidant properties and the mechanisms of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biol. Med.*, 31: 869-881.
- Li, Y., Gong, M., Konishi, T. 2007. Antioxidant synergism among component herbs of traditional Chinese medicine formula, ShengMai San studied in vitro and in vivo. *Journal of Health Science*, 53: 692-699.
- Li M.H., Jang J.-H., Sun B., Surh Y.J., 2004. Protective effects of oligomers of grape seed polyphenols against β -amyloid-induced oxidative cell death. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1030: 317-329.
- Long S.P., Humphries S, Falkowski P.G., 1994. Photo inhibition of photosynthesis in nature. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 45: 633-662.
- López-Alarcón C., R. Ortiz, J. Benavides, E. Mura, E. Lissi, 2001. Use of the orac-pyrogallol red/orac-fluorescein ratio to assess the quality of antioxidants in Chilean wines. *J. Chil. Chem. Soc.* vol. 56 no.3: 764-767.
- Loren, D.J., Seeram, N.P., Schulman, R.N., Holtzman, D.M., 2005. Maternal dietary supplementation with pomegranate juice is neuroprotective in an animal model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Pediatr. Res.* 57, 858-864.

- Lugasi A., Hovari J., Sagi K.V., Biro L., 2003. The role of antioxidant phytonutriments in the prevention of diseases. *Acta.Biologica.Szegedientsis*, 1-4: 119-125.
- Lovelock James ,1990. Hands up for the Gaia hypothesis. *Nature* 344, 100-102.
- Majchrzak D., Mitter S., Elmadfa I., The effect of ascorbic acid on total antioxidant activity of black and green teas. *Food Chem.*, 2004, 88, 447-451.
- McMichael, M. 2007. "Oxidative stress, antioxidants, and assessment of oxidative stress in dogs and cats." *JAVMA* 231(5): 714-720.
- Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Remesy,C., 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81: 230S-242S.
- Mandelker, L., 2008. Introduction to oxidative and mitochondrial dysfunction. *Vet Clin: Small Anim Practice. f. r. Oxidative stress: the role of mitochondria, and antioxidants*, Elsevier Inc. 38: 1-30.
- Mantle D., Eddeb F., Pickering A.T., Comparison of relative antioxidant activities of British medicinal plant species in vitro. *J. Ethnopharmacol.*, 2000, 72, 47-51.
- Marc, F., Brisbarre, F., Davin, A., Baccaunaud, M., Ferrand, C., 2004. Antioxidant potential evaluation (TEAC) of vegetable extracts for food use. *Sciences des Aliments*, 24: 399-414.
- Mayfield, J. E. & Duvall, M. R., 1996. Anomalous phylogenies based on bacterial catalase gene sequences. *J Mol Evol* 42, 469-471.
- Mensor L.I., Menezes F.S., Leitaog G., Reis A.S., Dos Santos T., Coube C.S., Leittao S.G., 2001. Screening of Brazilian plants extracts for antioxidants activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res.*, 15: 127-130.
- Mermelstein, N.H. 2011. IFT's 2011 scientific program offers many sessions on food safety & quality *Food Technology*, 65: 110-120.
- Maxwell PH1, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ., 1999. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999 May 20; 399(6733): 271-5.

- Meyer A.S., Yi O., Pearson, D. A., Waterhouse A.L., Frankel E.N., 1997. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*). *J. Agric. Food. Chem.*, 45: 1638-1643.
- Michiels C., Raes M., Toussaint O., Remacle J., 1994. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress, *Free Rad. Biol. Med.*, 17: 235-248.
- Miller N.J., Sampson J., Candeias L.P., Bramley PM., Rice-Evans CA., 1996. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett*, 384(3): 240-2.
- Miller NJ, RiceEvans CA., 1999. Spectrophotometric determination of antioxidant activity. *Redox Report*; 2: 161-171.
- Millin, DJ.; Swaine, D. and Dix, P.L. 1969. Separation and classification of the brown pigments of aqueous infusions of black tea. *J. Sci. Food Agric.*, 20: 296-302.
- Mitić S.S., Paunović D.D., Pavlović A.N., Tošić S.B., Stojković M.B., Mitić M.N., 2014. Phenolic profiles and total antioxidant capacity of marketed beers in Serbia. *Int. J. Food Prop.*, 17: 908-922.
- Nagasako-Akazome, Kanda Y, Ohtake T, Shimasaki Y Yhimasaki H., Kobayashi T. 2007. Apple polyphenols influence cholesterol metabolism in healthy subjects with relatively high body mass index. *Journal of Oleo Science*, 56, 417-428.
- Nakano, M., Itoh Y., Mizuno T., Nakashima H., 2007 Polysaccharide from *Aspalathus linearis* with strong anti-HIV activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1997, 61, 267-271.
- Nève, J. , 2002. Optimisation of dietary intake of anti-oxidants. *Nutrition Clinique et Metabolisme*, 16: 292-300.
- Noctor G., Gomez L., Vanacker H., Foyer C.H., 2002. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J. Exp. Bot.*; 53:1283-1304.
- Namba T, M. Hattori, J. N. Yie, Y. H. Ma, Y. Nomura, S. Kaneko, Y. Kitamura, T. Koizumi, K. Katayama and W. Lu, 1986. "Tu-Chung Leaves (I), Pharmacological Effects of the Water Extract in Vivo", *Journal of Traditional Medicine*, 3: 89-97.
- Nordberg J, Arnér ES., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredox in system. *Free Radic Biol Med.*, 31(11): 1287-312.

- Noctor G, Foyer CH., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 249-279.
- Novelli GP., 1997. Role of free radicals in septic shock. *J Physiol Pharmacol*, 48: 517-527.
- Obinger, C., Regelsberger, G., Furtmüller, P.G., Jakopitsch, C., Rüker, F., Pircher, A., Peschek, G.A., 1999. Catalase-peroxidases in cyanobacteria - Similarities and differences to ascorbate peroxidases. *Free Radical Research*, 31: S243-S249.
- O'Connell J.E., Fox P.F., 1999. Proposed mechanism for the effect of polyphenols on the heat stability of milk. *International Dairy Journal* 9(8): 523-536.
- Oracz K., El-Maarouf-Bouteau H., Farrant J., Cooper K., Belgazhi M., Job C., et al. 2007. ROS production and protein oxidation as a novel mechanism of seed dormancy alleviation. *Plant J.* 50 452-465.
- Ou B., Maureen H.W., Prior, R L., 2001. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4619-4626.
- Owuor E.D., Kong A.N., 2002. Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol*, 64(5-6): 765-70.
- Ozcelik B, Lee JH, Min DB., 2003. Effects of light, oxygen, and pH on the absorbance of 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. *J Food Sci.*, 68(2): 487-490.
- Packer L., Witt E.H., Tritschler H.J., 1995. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant *Free Radical Biology and Medicine* Volume 19, (2): 227-250.
- Parent C., Capelli N., Dat J. 2008. Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes. *C.R. Biologies*. 331: 255-261.
- Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., Del Rio D., Salvatore S., Bianchi M., Brighenti F., 2003. Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. *J.Nutr*, 133: 2812-2819.
- Penel, N., Fournier, C., Clisant, S., N'Guyen, M. 2004. Causes of fever and value of C-reactive protein and procalcitonin in differentiating infections from paraneoplastic fever. *Supportive Care in Cancer*, 12: 593-598.
- Pietta, P.G., 2000. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, 63: 1035-1042.

- Phipps S, Long AM, Ogden J., 2007. Benefit finding scale for children, Preliminary findings from a childhood cancer population. *Journal of Pediatric Psychology*, 32(10): 1264-1271.
- Poblete C., Lopez-Alaracon B.E., Lissi C., 2009. Campos oxygen radical antioxidant capacity ORAC values of herbal teas obtained employing different methodologies can provide complementary data. *J. Chil. Chem. Soc.*, 54: 2.
- Poulos, T. L., Edwards, S. L., Wariishi, H. and Gold, M. H., 1993. Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 Å. *Journal of Biological Chemistry* 268: 4429-4440.
- Powers, S. and M. Jackson, 2008. "Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production." *Physiol Rev* 88: 1243-1276.
- Prior R.L., Wu X., Schaich K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolic in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food. Chem.*, 53: 4290-302.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improvised ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- Ribereau-Gayon P. (1968) *Les composés phénoliques des végétaux*. Ed. Dunod, Paris, 254 p.
- Rice-Evans C., 2001. Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*, 8: 797-807.
- Richelle, M., Tavazzi, I., Offord, E., 2001. Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa, and tea) prepared per cup serving. *J. Agric. Food Chem.* 49: 3438-3442.
- Rinalducci Sara, Leonardo Murgiano and Lello Zolla. 2008. Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 59: 3781-3801.
- Roberts, E.A.H. and Smith, R.F., 1961. Spectrophotometric measurement of theaflavin and thearubigins in black tea liquors in assessments of quality of teas. *Analyst*, 86: 94-8.
- Roginsky V., Lissi E.A, 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem*, 92: 235-254.

- Ruiz-Dueñas, F.J., Camarero, S., Pérez-Boada, M., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (2001) A new versatile peroxidase from *Pleurotus*. *Biochem Soc Trans* 29: 116-122.
- Rusaczonek Anna, Świdorski Franciszek, Waszkiewicz-Robak Bożena, 2010. Antioxidant properties of tea and herbal infusions - a short report polish. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, Vol. 60(1): 33-35.
- Ruel G, Pomerleau S, Couture P, Lemieux S, Lamarche B, Couillard C., 2008. Low-calorie cranberry juice supplementation reduces plasma oxidized LDL and cell adhesion molecule concentrations in men. *Br J Nutr.* 99: 352-359.
- Sanchez-Moreno Concepcion, Lucia Plaza, Begona de Ancos, M. Pilar Cano, 2006. Nutritional characterisation of commercial traditional pasteurised tomato juices: carotenoids, vitamin C and radical-scavenging capacity. *Food Chemistry* 98: 749-756.
- Sandhar Harleen Kaur, Mohanjit Kaur, Prashant Tiwari, Manoj Salhan, Pardeep Sharma, Sunil Prasher, Bimlesh Kumar, 2011. Chemistry and Medicinal properties of *Holoptelea Integrifolia*. *International Journal of Drug Development and Research*, 03: 06-11.
- Sánchez Samaniego, Troncoso González, A.M., García-Parrilla, M.C., Quesada Granados, J.J., López García de la Serrana, H., López Martínez, M.C. 2007. Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytica Chimica Acta.*, 593: 103-107.
- Schalbert, A. & Williamson, G. 2000. Dietary intake and biosynthesis of polyphenols. *Journal of Nutrition*, 130: 2073S-2085.
- Scalzo J, Politi A, Pellegrini N, Mezzetti B, Battino M., 2005. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition*, 21(2): 207-213.
- Schalbert A, Williamson G., 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr.*, 130: 2073-2085.
- Schwartz Elinor, Revital Tzulker, Ira Glazer, Irit Bar-Ya'akov, Zeev Wiesman, Effi Tripler, Igal Bar-Ilan, Hillel Fromm Hamutal, Borochoy-Neori, Doron Holland and Rachel Amir, 2009. Environmental Conditions Affect the Color, Taste, and Antioxidant Capacity of 11 Pomegranate Accessions' Fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 57(19): pp. 9197-9209.
- Schlesier, K., Harwat, M., Bohm, V. & Bitsch, R. 2002. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research*, 36, 177-187.

- Shahidi F, 2000. Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung*. 2000, 44(3): 158-63.
- Seeram N.P., Aviram M., Zhang Y., Henning S.M., Feng L., Dreher M., Heber D., 2008. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *J. Agric. Food Chem*, 56: 1415-1422.
- Serafini, M., G. Maiani, and A. Ferro-Luzzi. 1998. Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *J. Nutr.* 128: 1003-1007.
- Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL., 2007. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci* 27: 2866-2875.
- Sies H, 1991. *Introduction in: Oxidative stress, oxidants and antioxidants*. London Academic Press, 15-22.
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidant substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 299: 152-178.
- Singleton V.L, Rossi J.A.J.R, 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult*, 16: 144-58.
- Skrede, G., Wrolstad, R.E., Durst, R.W., 2000. Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) *Journal of Food Science*, 65: 357-364.
- Smith L.I., 2002. A tutorial on Principal Components Analysis.
- Stangl, V., Dreger, H., Stangl, K. and Lorenz, M. (2007) Molecular targets of tea polyphenols in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 73: 348-358.
- Sratil Pavel, Bořivoj Klejdus, Vlastimil Kubáň, 2006. Determination of Total Content of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Vegetables - Evaluation of Spectrophotometric Methods. *J. Agric. Food Chem.*, 54(3): pp 607-616.
- Sun AY., Simonyi A., Sun GY., 2002. The "French paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols." *Free Radical Biology and Medicine* 32(4): 314-318.

- Takahama Umeo, 2004. Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: Physiological significance of the oxidation reactions. *Phytochemistry Reviews* 3: 207-219.
- Tessier F., P Marconnet, 1995. Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science & Sports* Volume 10: 1-13.
- Teow C.C., Van-Den Truong, McFeeters R.F., Thompson R.L., Pecota K.V., Yencho G.C., 2007: Antioxidant activities, phenolic and β -carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. *Food Chemistry*, 103: 829-838.
- Toda S., 2005. "Antioxidative Effects of Polyphenols in Leaves of *Houttuynia Cordata* on Protein Fragmentation by Copper-Hydrogen Peroxide in vitro," *Journal of Medicinal Food*, 8: 266-268.
- Torres, J. A., Velazquez, G., 2005. Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. *Journal of Food Engineering*, 67: 95-112.
- Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes CJ., Telser J., 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Mol. Cell Biochem*, 266: 37-56.
- Valko M., Rhodes C.J., Moncola J., Izakovic M., Mazur M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* Chemico, 160: 1-40.
- Van den Berg, R., Haenen, GRMM., Van den Berg, H., Bast, A. 1999. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem.*, 66, 511-517.
- Van Der Sluis AA, Dekker M, 2002. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 1. Effect of existing production methods. *J. Agric. Food Chem.*, 50(25): 7211-9.
- Verdan AM, Wang HC, García CR, Henry WP, Brumaghim JL., 2011. Iron binding of 3- hydroxychromone, 5-hydroxychromone, and sulfonated morin: Implications for the antioxidant activity of flavonols with competing metal binding sites. *J Inorg Biochem.*, 105: 1314-22.
- Von Gadow, A.; Joubert, E.; Hansmann, C.F. 1997. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT, and BHA. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 632-638.

- Wada L, Ou, B., 2002. Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberries. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 3495-3500.
- Waheed Abdul, F.S. Hamid, A. H. Shah, Habib Ahmad, Ambreen Khalid 5 , Fida M. Abbasi, N. Ahmad, Sohail Aslam, Sair Sarwar, 2012. Response of different tea (*Camellia sinensis* L.) clones against drought stress. *J. Mater. Environ. Sci.* 3(2): 395-410.
- Walker D.A., 2001. Like Clockwork - An Unfinished Story. Oxygraphics. p. 11-12.
- Wang, M. Y., Dhingra, K., Hittelman, W. N., Liehr, J. G., deAndrade, M., & Li, D. H. (1996). Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde-DNA adducts in human breast tissues. *Cancer Epidemiol. Biomark Prev.*, 5, 705-710.
- Wasserman H., Murray R, 1979. Singlet Oxygen: Organic Chemistry 40, Academic Press New York, 40: 575-595.
- Welinder, K.G. 1992. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2: 388-393.
- Wilson K C, Clifford MN (1992). In: Tea, Cultivation to Consumption. London: Chapman and Hall.
- Wolf R., Wolf D., Ruocco V, 1998. Vitamin E: The radical protector. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 10(2): 103-117.
- Wolfe K., Wu X., Liu RH., 2003. Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem.*, 51(3): 609-14.
- Wright, J. S.; Johnson, E. R.; DiLabio, G., 2001. Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.*, 123: 1173-1183.
- Wu X., Beecher GR., 2004. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J Agric Food Chem.*; 52: 4026-4037.
- Xu, A., Vita, J.A., Keaney Jr., J.F., 2000. Ascorbic acid and glutathione modulate the biological activity of S-nitrosoglutathione. *Hypertension*, 36: 291-295.
- Yamasaki H, Sakihama Y, Ikebara N., 1997. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiol.*, 115: 1405-1412.

- Yang J.J., Chen B, Yan G., 2012. Pharmacological evaluation of tea polysaccharides with antioxidant activity in gastric cancer mice. *Carbohydr. Polym.*, 90(2): 943-94.
- Yen, G.C., Chen, H.Y., 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity, *J Agric Food Chem.* 43: 27-32.
- Yu R., Mandlekar S., Tony Kong A.N., 2000. Molecular mechanisms of butylated Hydroxyanisole induced toxicity: induction of apoptosis through direct release of cytochrome c. *Molecular Pharmacology*, 58: 431-437.
- Zamocky M. and F. Roller, 1999. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 72: 19-66.
- Zago E., S. Morsa, J.F. Dat, P. Alard, A. Ferrarini, D. Inze, M. Delledonne, F., 2006. Van Breusegem, Nitric oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco, *Plant Physiol.* 141: 404-411.
- Zhou, B., Wu, L.-M.; Yang, L., Liu, Z.-L, 2005. Evidence for alpha-tocopherol regeneration reaction of green tea polyphenols in SDS micelles. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 78-84.
- Zujko M., Witkowska A., Kiernozek B., 2005. Antioxidant activities of herbal infusions. *Brom. Chem. Toksykol.*, 37:189-191.